

**Bestimmung von Prostaglandinen im Plasma
in Beziehung zur Thrombozytenfunktion
bei insulinpflichtigen Diabetikern**

Peter J. Eyrich

München

1987



Aus der III. Medizinischen Abteilung des
Akademischen Lehrkrankenhauses München-Schwabing
(Vorstand: Prof. Dr. H. Mehnert)

**Bestimmung von Prostaglandinen im Plasma in
Beziehung zur Thrombozytenfunktion bei
insulinpflichtigen Diabetikern**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter J. Eyrich
aus
München
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatte:r: Priv. Doz. Dr. H. U. Janka

Mitberichterstatte:r: 1. Prof. Dr. H. Mehnert
2. Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1987

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. H. Mehnert für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. H.-U. Janka für die weitreichende und umfassende Anleitung, die stets freundliche Betreuung, für anregende Hinweise und Diskussionen.

Fräulein U. Helwig danke ich herzlich für die zuverlässige Unterstützung bei den im Labor durchgeführten Messungen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Liste der Abkürzungen	
1. EINLEITUNG	1
2. THROMBOZYTENPHYSIOLOGIE UND -PATHO- PHYSIOLOGIE NACH DEM GEGENWÄRTIGEN STAND DER FORSCHUNG	5
3. THROMBOXAN B ₂ UND 6-KETO- PROSTAGLANDIN F _{1α}	8
3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zu Prostaglandinen	8
3.2 Einfluß der Prostaglandine auf die Thrombozytenfunktion	10
4. PATIENTEN UND METHODEN	16
4.1 Patienten- und Kontrollpersonenauswahl	16
4.2 Blutabnahmen	16
4.3 Thrombozytenaggregation (TA)	17
4.3.1 ADP induzierte TA	17
4.3.2 Spontane TA	21
4.4 Bestimmung des Faktor VIII assoziierten Antigens	24
4.5 β-Thromboglobulin	25
4.6 Thromboxan B ₂	28
4.7 6-keto-Prostaglandin F _{1α}	33
4.8 Weitere klinisch-chemische Analysen	35

4.9	Ermittlung und Klassifikation der Retinopathie	35
4.10	Statistische Prüfverfahren	36
5.	ERGEBNISSE	37
5.1	Thrombozytenaggregation (TA)	37
5.1.1	ADP induzierte TA	37
5.1.2	Spontane TA	38
5.2	Faktor VIII assoziiertes Antigen	40
5.3	β -Thromboglobulin	41
5.4	Thromboxan B_2	42
5.4.1	"Plasmaspiegel"	42
5.4.2	"Vollblutwert"	43
5.4.3	"0,5-" und "2,5 μ g Kollagenwert"	43
5.5	6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$	45
5.5.1	"Plasmaspiegel"	45
5.5.2	"Vollblutwert"	46
5.5.3	"0,5-" und "2,5 μ g Kollagenwert"	46
5.6	Korrelationsrechnungen	48
5.6.1	Korrelationen mit ADP-Schwellen- konzentration	48
5.6.2	Korrelationen mit Thromboxan B_2 und 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$	49
5.7	Verlaufskontrolle der Gerinnungs- parameter	50
6.	DISKUSSION	53
6.1	Thrombozytenaggregation (TA)	53
6.1.1	Problematik der Messung und Auswertung	53
6.1.2	TA-Tests bei Diabetikern	54
6.2	Faktor VIII assoziiertes Antigen	56
6.3	β -Thromboglobulin	57

6.4	Plasmaspiegel der Prostaglandine	59
6.4.1	Problematik der Messung und Auswertung	59
6.4.2	Prostaglandinbestimmungen bei Diabetikern	61
6.5	Stoffwechsellage und Thrombozytenfunktion	64
6.6	Abschließende Betrachtungen der Ergebnisse	67
7.	ZUSAMMENFASSUNG	70
8.	LITERATURVERZEICHNIS	74

Liste der Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ADP - 50 % A	50 %-Aggregation (= ADP-Schwellen- konzentration)
ATP	Adenosintriphosphat
CAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
D	Diabetiker
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOAc	Essigsäureethylacetat
F VIII R : Ag	factor VIII related antigen
Hb A _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
K	Kontrollpersonen
6-keto-PG F _{1α}	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
MeOH	Methanol
PAT	Plättchen-Aggregations-Test
PG	Prostaglandin
PG I ₂	Prostaglandin I ₂ (= Prostazyklin)
PRP	Plättchen-reiches Plasma
RIA	Radioimmunoassay
R.d.	Retinopathia diabetica
TA	Thrombozytenaggregation
β-TG	β-Thromboglobulin
TX A ₂	Thromboxan A ₂
TX B ₂	Thromboxan B ₂

1. EINLEITUNG

Der Diabetes mellitus präsentiert sich für den Patienten in erster Linie als eine Störung des Glucose-Stoffwechsels, die aber nur einen Teilaspekt dieser chronischen Erkrankung darstellt. Das Leben des Diabetikers (D) und auch seine Lebenserwartung (173) werden bestimmt durch das Auftreten von vaskulären Komplikationen, die mindestens zu einem Teil auch pathophysiologisch mit der langfristigen Störung des Stoffwechsels beim Diabetes in Zusammenhang stehen.

Haupttodesursachen beim D sind in mehr als 75 % Gefäßkrankungen (113). Dabei sind für den Diabetes mikroangiopathische Veränderungen der Kapillaren spezifisch, die klinisch als Retino- und Nephropathie imponieren. Die Makroangiopathie mit dem typischen Bild der Arteriosklerose tritt beim D im Vergleich zu Gesunden früher, ausgeprägter und häufiger auf (26/50).

In neuerer Zeit wurden Theorien über die Pathogenese sowohl der Makro- als auch Mikroangiopathie des D entwickelt, die der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion eine bedeutende Rolle zuerkannt haben (4/69/154/155). Für die Arteriosklerose gehen sie von der Virchow'schen These der Verletzung der Intima und einer sekundären pathologischen Gefäßwandreaktion aus (177). Am Beginn steht ein Endothelschaden, an dem eine Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten einsetzt. Folge ist eine Sekretion von Plättcheninhaltsstoffen, die ihrerseits eine zusätzliche Thrombozytenaggregation (TA) bewirkt. Außerdem konnte einer dieser aus Thrombozyten-Granula freigesetzten Stoffe als ein Plättchen-Wachstumsfaktor isoliert werden (155), der im Bereich der Verletzung die Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Tunica media und ihre Einsprossung in

die Intima stimulieren kann. Ansammlungen von Lipiden in diesen Zellen und herdförmige Verkalkungen führen zu atheromatösen Beeten, die, wenn dieser Prozeß nicht durch gegenregulatorische Mechanismen unterbrochen wird, durch weitere Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten die Entstehung thrombotischer Auflagerungen fördern (154).

Plättchen-Thromben und mikrovaskuläre Obliterationen sind auch charakteristisch für die diabetische Mikroangiopathie (27/80). Ähnlich der Pathogenese der Makroangiopathie wird ein initialer Endothelschaden angenommen, an dem, besonders an Stellen, an denen die Basalmembran freiliegt, eine Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten stattfindet (27). Da der Funktionszustand der Thrombozyten bei der Gefäßwand-Thrombozyten-Interaktion von großer Bedeutung sein dürfte, wird eine gesteigerte Aggregationstendenz der Thrombozyten als Risikofaktor für die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen diskutiert (13/16).

Bei D, insbesondere mit Gefäßkomplikationen, konnte wiederholt eine erhöhte Thrombozytenaggregabilität nachgewiesen werden (27/86/157). Die Stoffwechselstörung des Diabetes könnte für die veränderte Thrombozytenaggregation in vitro verantwortlich sein (91/141/144). Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die abnorme Funktion Ursache oder Folge der Angiopathie war, außerdem sind die Befunde nicht unwidersprochen geblieben (32/64/140).

Das Verständnis der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen wurde durch die Entdeckung der Prostaglandine erheblich gefördert. Die Metaboliten der Arachidonsäure, besonders die sehr instabilen Abkömmlinge Thromboxan A_2 ($TX A_2$) und Prostazyklin ($PG I_2$) üben einen großen Einfluß auf die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Gefäßwand aus (57/69/124).

TX A₂ wird hauptsächlich im Thrombozyten gebildet. Es besitzt dem in der Gefäßwand produzierten PG I₂ entgegengesetzte Wirkungen, d.h. es fördert durch eine Senkung des endothrombozytären Gehalts an zyklischem AMP (cAMP) die Plättchenaggregation und kontrahiert die Blutgefäße (57). PG I₂ stimuliert die membranständige Adenylatzyklase und das gebildete cAMP und hemmt die Thrombocytenaggregation und die TX A₂-Synthese (43/175). PG I₂ scheint ein physiologisches Antithromboticum zu sein. Der Sinn seiner Synthese dürfte darin bestehen, eine unkontrollierte, überschießende Thrombozytenaggregation, die zu einer massiven Plättchen-Thrombus-Bildung mit Stenosierung des Gefäßlumens führen könnte, zu verhindern (104).

Bei Patienten mit Diabetes mellitus liegt eine verstärkte Thromboxan-Synthese vor (65), während die Angaben in der Literatur für die Höhe der Synthese von PG I₂ widersprüchlich sind (41/42/104).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, stabile Metaboliten dieser antagonistisch wirkenden Prostaglandine quantitativ bei Diabetikern mit und ohne Gefäßkomplikationen im Plasma zu bestimmen.

Es wurde versucht, sie in Bezug zu den aktuellen Stoffwechselfparametern und zu den Ergebnissen der in vitro Thrombozytenaggregation zu setzen. Hinweise auf die Thrombozytenaktivität in vivo sollten durch Messungen des β -Thromboglobulins gewonnen werden. Weiterhin wurde das Material des von-Willebrand-Faktors, das mit heterologen Antiseren präzipitiert, und das für die Thrombozyten-Adhäsivität verantwortlich ist und "factor VIII related antigen" (F VIII R : Ag) genannt wird, bestimmt (146).

Darüber hinaus wurde versucht, durch unterschiedliche Stimulation der TA nach der Blutentnahme für die Bestimmung der Prostaglandine Einblick in die Validität, Zuverlässig-



keit und Beeinflußbarkeit der verwendeten Radioimmunoassays zu gewinnen.

Die Wiederfindungsrate des Plasma-Extraktionsverfahrens wurde ebenfalls überprüft.

Weiterhin wurden Hinweise auf die Stoffwechselabhängigkeit, bzw. Einfluß der Diabeteseinstellung auf die Plasmaspiegel der Prostaglandine im Vergleich zu anderen Gerinnungsparametern gewonnen.

2. THROMBOZYTENPHYSIOLOGIE UND -PATHOPHYSIOLOGIE NACH DEM GEGENWÄRTIGEN STAND DER FORSCHUNG

Die wichtigste Funktion der Thrombozyten ist die Beteiligung an der Hämostase. Hierfür weisen sie einen sehr intensiven Energiestoffwechsel auf, der für die kontraktilen und sekretorischen Funktionen im Hämostasemechanismus von grundlegender Bedeutung ist. Die Glykolyserate ist beispielsweise 13 mal so hoch wie bei Erythrozyten (94). Energie wird im hauptsächlichsten aus dem gespeicherten Glykogen und aus Glucose bereitgestellt, der Abbau erfolgt sowohl über aerobe Oxidation als auch über die anaerobe Glykolyse. Die Verformbarkeit der Thrombozyten sowie ihre sekretorischen Funktionen bei der Hämostase werden durch eine große Anzahl kontraktiler Elemente ermöglicht (63/163).

Gerät ein Thrombozyt mit geschädigten Gefäßen in Kontakt, deren Endothel verletzt ist, wodurch die darunter liegenden Kollagenschichten freigelegt werden, kommt es zur Adhäsion und unter Ausbildung von Pseudopodien zur darauffolgenden Aggregation. Dabei setzen die aktivierten Thrombozyten aus zytoplasmatischen Granula Inhaltsstoffe frei, die den Ablauf der Blutstillung beeinflussen (u.a. ADP und Thromboxan A_2) (67/69/182), und eine weitere Aggregation von zirkulierenden Plättchen verursachen. Thrombozytenfunktion (zelluläre Blutstillung) und plasmatische Gerinnung sind hierbei sich ergänzende Vorgänge: Aggregierende Blutplättchen lagern an ihrer Oberfläche Fibrinogen an, das sie untereinander verbindet (166).

Für den Aggregationsvorgang der Thrombozyten werden heute drei ineinandergreifende Prozesse verantwortlich gemacht: Die Thromboxan A_2 -Synthese, die Ca^{2+} -Mobilisation und die Freisetzungsreaktion von Plättcheninhaltsstoffen (110).

Das bei der Thrombozytenaktivierung als Endprodukt aus Arachidonsäure gebildete TX A₂ (67/69/182) stimuliert die Ca²⁺-Freisetzung aus Speichern. Dieser intrazelluläre Anstieg von ionisiertem Ca führt zu einer Hemmung der thrombozytären Adenylatzyklase und zu einer Senkung des cAMP-Spiegels (57/151). Dieser Vorgang intensiviert die Ca²⁺-Mobilisation und führt zur Freisetzungsreaktion.

TX A₂ fördert die Plättchenaggregation (69/70/77/160), während das vom Endothel gebildete Prostazyklin (PG I₂) physiologischerweise eine dem TX A₂ entgegengesetzte Wirkung hat und einen Hemmer der Aggregation darstellt (69/96/153/171/182). Seine aggregationshemmende Wirkung geht mit einer Erhöhung des cAMP-Gehalts im Thrombozyten infolge Stimulation der Adenylatzyklase einher (22/43/59/119/124/175). Ist die Intima intakt, so ist Prostazyklin in der Lage, lokale Plättchenaggregate aufzulösen (112/182). Kommt es jedoch zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen TX A₂ und PG I₂, folgt daraus eine Störung der Hämostase, d.h. Blutungsneigung oder Thrombose (69).

Die Resistenz des intakten Endothels gegenüber der Adhäsion von Thrombozyten wird durch weitere Mechanismen erklärt: Hierbei wurden bestimmte Glykoproteine an der Zelloberfläche, die Glykokalix mit ihrer Oberflächenladung, beschrieben (48). Außerdem stellt eine lokale Anreicherung von Adenosin, das sich aus dem Metabolismus der energiereichen Phosphate herleitet, einen potenten Gefäßdilator und Hemmer der TA dar (54/105/138).

Thrombozyten spielen auch eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Angiopathien.

Für den Beginn der Atherogenese wurde in neuerer Zeit eine Theorie entwickelt, die von der Virchow'schen These der Verletzung der Intima ausging (177). Eine These, der eine biochemische Grundlage gegeben wurde (154/155). In

der Folge käme es zur Ausbildung atheromatöser Plaques (4/28/45/69/147/154/182). Thrombozyten, die am Ort des Intimaschadens haften bleiben, setzen einen Wachstumsfaktor frei, der die Proliferation von glatten Muskelzellen der Tunica media und ihrer Einsprossung in die Intima stimulieren kann. Diese Zellen führen zur Ausbildung von atheromatösen Beeten. Normalerweise regeneriert sich das Gefäßendothel nach der Verletzung (154), eine wiederholte Gefäßschädigung führt jedoch zu chronischen Reperaturmechanismen bis hin zur Atherombildung (69/154/182).

Auch der von-Willebrand-Faktor, ein Protein das die Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel vermittelt (158), unterstreicht die Bedeutung der Blutplättchen für die Atherogenese. Dieser Faktor ist in Tiermodellen der Atherosklerose neben Verletzung der Intima und Thrombozytenaktion erforderlich (182). Schweine mit einem Mangel an diesem von-Willebrand-Faktor haben eine gestörte Thrombozytenadhäsivität und sind deshalb weitgehend gegenüber der Atherosklerose resistent (49/62).

Da die Thrombozyten von größter Bedeutung bei der Pathogenese von Angiopathien sind, stellt sich die Frage nach der Thrombozytenfunktion bei Diabetikern, da diese Patienten in hohem Maße von mikro- und makroangiopathischen Komplikationen betroffen sind (82/84/88).

3. THROMBOXAN B_2 UND 6-KETO-PROSTANGLANDIN $F_{1\alpha}$

3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zu Prostaglandinen

Vor mehr als 50 Jahren beschrieben von Euler (39) und Goldblatt (56) unabhängig voneinander einen lipidartigen Faktor in der Samenflüssigkeit, der eine stimulierende Wirkung auf die glatte Muskulatur zeigte und den Blutdruck senkte. Von Euler nannte 1935 dieses blutdrucksenkende Prinzip Prostaglandin (PG) (38). Als wesentlichen Bildungsort dieses Faktors nahm er die Prostata an - eine Auffassung, die sich später nicht bestätigte. Außerdem erwies sich "Prostaglandin" nicht als eine einheitliche Substanz, sondern als eine Gruppe oxygenierter Polyenfettsäuren mit gemeinsamen Strukturmerkmalen.

Durch Bergström und Mitarbeiter wurden 1957 die ersten beiden Prostaglandine in kristalliner Form isoliert (9) und 1962 ihre Struktur aufgeklärt (8). Die ersten Synthesen von Prostaglandinen gelangen aus Fettsäurevorstufen 1964 (36). Zahlreiche Prostaglandine sind seitdem charakterisiert, isoliert und synthetisiert worden.

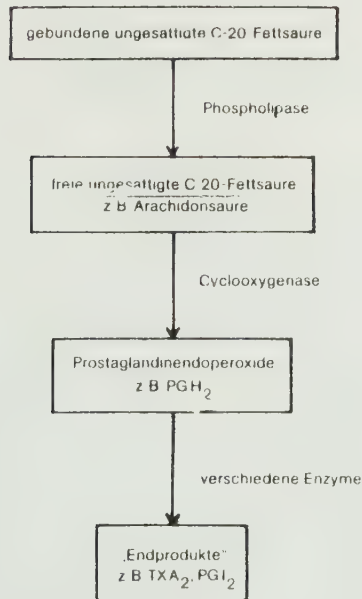
Der Begriff Thromboxan entstand aufgrund des ersten chemischen Nachweises dieser Substanz im Thrombozyten und des Vorhandenseins einer Oxanringstruktur. Diese Struktur wurde durch die Gruppe um Samuelsson 1975 aufgeklärt (68).

Johnson et al. (88) und Corey et al. (30) entdeckten eine Substanz, die sie Prostazyklin nannten, da sie zwei Ringstrukturen enthält.

Prostaglandine können mit Ausnahme kernloser Erythrozyten und Lymphozyten von allen tierischen Zellen gebildet werden. Bei ihrer enzymatischen Biosynthese lassen sich drei Abschnitte unterscheiden: 1. Bereitstellung von Vorstufen, 2. Biosynthese von Prostaglandinendoperoxiden,

3. Transformierung von PG - Endoperoxiden in Endprodukte. Dieser Stoffwechselweg, der zu verschiedenen Prostaglandinen führt, wird auch als Cyclooxygenaseweg bezeichnet. Freie Arachidonsäure (AA) stellt hierbei die wichtigste Fettsäurevorstufe dar (7/101/150).

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese von Prostaglandinen



Die physiologische Bedeutung der PG-Endoperoxide der AA, PG G₂ und PG H₂ besteht darin, Substrat für die nachfolgenden enzymatischen Umsetzungen zu sein (126/134).

Im Gegensatz zur uniformen Bildung von PG-Endoperoxiden durch die Fettsäurecyclooxygenase sind die weiteren Transformationen dieser Substanzen zell- bzw. gewebsspezifisch. Je nach Zelltyp ist das metabolische Schicksal der PG-Endoperoxide bestimmt durch die Substratmenge (Endoperoxide), Art und Aktivität der metabolisierenden Enzyme und Kofaktoren (100). Das Enzymmuster variiert ebenfalls: So entsteht aus PG H₂ in den meisten Gefäßen überwiegend PG I₂, aber kein TX A₂ (126), während TX A₂ der überwiegende Endoperoxidmetabolit der Thrombozyten ist (67).

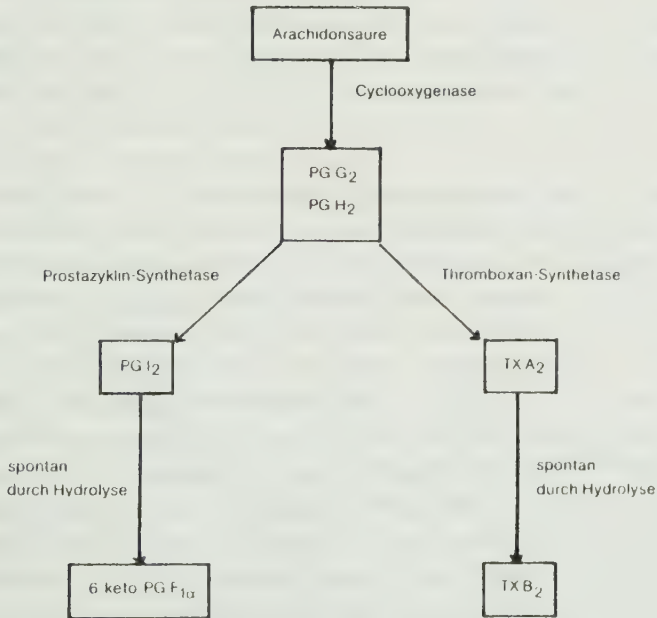
3.2 Einfluß der Prostaglandine auf die Thrombozytenfunktion

Größten Einfluß auf die Thrombozytenfunktion üben das thrombozytäre, aggregationsfördernde Thromboxan A₂ und das dazu antagonistisch wirkende, vom Endothel synthetisierte Prostazyklin aus (57/69/124).

Bei der TX A₂-Synthese ist die Vorstufe Arachidonsäure in den Plättchenphospholipiden enthalten, die hauptsächlich in intrazellulären Membranen lokalisiert sind (99/148). Stimulation der Thrombozyten führt zur Hydrolyse der Phospholipide und zur AA-Freisetzung (164). Freie Arachidonsäure wird entweder in Phospholipide aufgenommen oder durchläuft den Cyclooxygenaseweg, der zur Entstehung der PG-Endoperoxide PG G₂ und PG H₂ führt (67). Diese sind instabil und Substrat der Thromboxansynthetase (68), die die Bildung von TX A₂ katalysiert. TX A₂ ist in wässriger Lösung bei physiologischem pH und 37° C sehr instabil (68), als spontanes Hydrolyseprodukt entsteht TX B₂.

PG I₂ wird durch eine membrangebundene Prostazyklin-Synthetase aus dem PG-Endoperoxid PG H₂ im Endothel katalysiert. Als Vorstufe dient ebenso AA aus Phospholipiden (126). PG I₂ ist in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen nicht stabil (21). Durch Hydrolyse entsteht als stabiles Produkt 6-keto-PG F_{1α}.

Abbildung 2: Darstellung der Synthese und der Metabolisierung von Thromboxan A₂ und PG I₂



Von den zahlreichen AA-Metaboliten in Thrombozyten können nur die Endoperoxide PG G_2 und PG H_2 sowie TX A_2 direkt Plättchen aggregieren. Eine Transformation der Endoperoxide in TX A_2 ist für die aggregationsfördernde Wirkung wahrscheinlich nicht erforderlich. TX A_2 wirkt jedoch auf molarer Basis wesentlich stärker als PG H_2 (58/111).

Der die Aggregation stimulierende Wirkungsmechanismus von TX A_2 ist nur teilweise geklärt. Die Aggregation der Thrombozyten beginnt mit einer Bindung aggregationsfördernder Substanzen wie Thrombin oder Kollagen an einen spezifischen Rezeptor an der Plättchenmembran. Dies bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} mit einer Stimulation der Sekretion von Granulationsinhaltsstoffen (ADP, ATP, Serotonin, Ca^{2+}) und Aktivierung von Phospholipasen. Letzteres führt zur AA-Freisetzung und Metabolisierung unter Bildung von Thromboxan. Aggregationsfördernde Prostaglandine binden an spezifische Bindungsstellen an der Zellmembran (3/133) und stimulieren die Ca^{2+} -Freisetzung aus Bindungsstellen. Diese Ca^{2+} -Mobilisierung führt dann zu einer Senkung des cAMP-Spiegels und einer Hemmung der Ca^{2+} -Aufnahme in intrazelluläre Speicher (57/151). Ein direkter Nachweis von Thromboxanrezeptoren an der Plättchenmembran ist bisher nicht gelungen. Aus Untersuchungen mit synthetischen Analoga und Inhibitoren von PG-Wirkungen wurde auf einen Plättchen-stimulierenden Rezeptor an der Zellmembran geschlossen, der von PG-Endoperoxiden und TX A_2 besetzt wird und zur Thrombozytenaggregation führt (109). Aus der Bindung von TX A_2 /PG-Endoperoxiden folgt eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Hemmung der cAMP-abhängigen Aufnahme in Speicherstrukturen und eine Stimulation der Freisetzungsreaktion (55). Dies bewirkt eine Stimulation kontraktile Plättchenproteine, eine Sekretion von Granulabestandteilen und eine weitere Freisetzung von AA mit nachfolgender Transformierung.

rung in Endoperoxide und Thromboxan (183). Unter Bildung einer positiven Rückkoppelung führen diese Substanzen zu einer weiteren Aktivierung von Thrombozyten (5).

Das bedeutendste aggregationshemmende Prostaglandin ist PG I_2 , das dominierende Endprodukt des Cyclooxygenaseweges im Endothel. PG I_2 ist auf molarer Basis der wirksamste Inhibitor der TA. Diese Reaktion scheint auf einer Stimulation der cAMP-Bildung zu beruhen (10/59). Diese Erhöhung des cAMP-Spiegels von Thrombozyten erfolgt durch Stimulation der Adenylatzyklase, des thrombozytären, membranständigen Effektorenzyms des Prostazyklins, nach Bindung von PG I_2 an einen Membranrezeptor (109/118). Die Erhöhung des Plättchen-cAMP führt zu einer Stimulation der Ca^{2+} -Sekretion aus dem Cytosol in die Speichergranula der Zellmembran (40/53). Daraus folgt eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung gegenüber membranwirksamen Reizen (95) und eine Hemmung der Phospholipaseaktivierung, d.h. der Freisetzung von AA (102/120).

Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen bestehen in einer gegenseitigen Beeinflussung der Prostaglandinbildung. Thrombozyten scheinen durch Bereitstellung von Vorstufen (AA, PG-Endoperoxide) die Biosynthese von PG I_2 zu stimulieren. Daraus würde eine Hemmung der TA sowie eine Gefäßdilatation folgen.

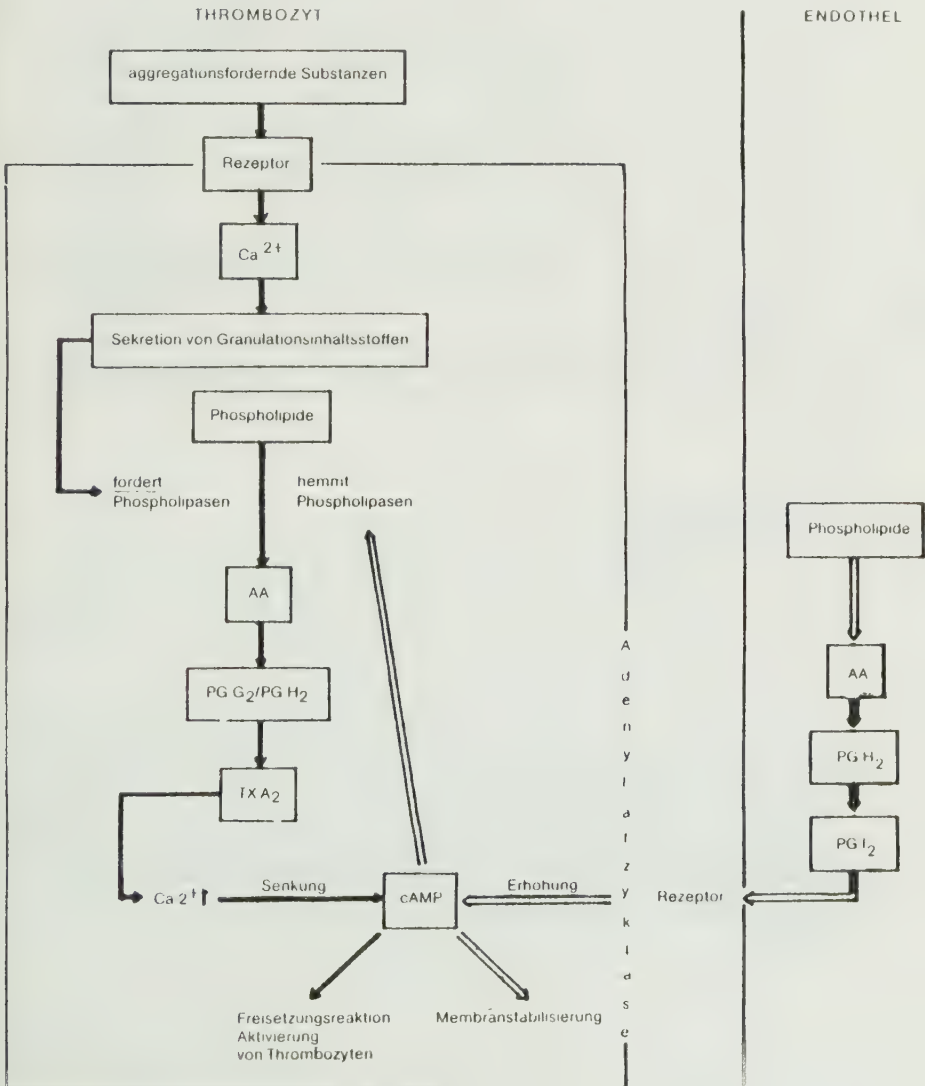
Die Resistenz des Endothels gegenüber der Adhäsion von Thrombozyten wurde nach Entdeckung des PG I_2 durch seine thrombozytenstimulierende Bildung erklärt. PG I_2 hemmt die Adhäsion und Thrombusbildung nach lokaler Applikation von ADP an die Gefäßwand in vivo (73). Jedoch sind die hierfür benötigten Konzentrationen wesentlich höher als diejenigen, die zur Aggregationshemmung erforderlich sind (73). Dies stellt die physiologische Relevanz dieses Be-

fundes in Frage, da die Plasmaspiegel der Substanz als sehr gering beschrieben wurden (149).

Im Tierversuch konnte die negative Korrelation zwischen PG I₂-Bildung durch die Gefäßwand und Ablagerung von Thrombozyten an das Endothel nach Gefäßwandschädigung nachgewiesen werden (176). PG I₂ hemmt die Thrombozytenablagerung an subendotheliale Abschnitte der Gefäßwand (74/181). Dies spricht dafür, daß für die Thrombusentstehung in Gefäßen mit PG I₂-Bildung eine lokale PG I₂-Synthese durch die glatten Muskelzellen der Media für die Verhinderung der Thrombozytenablagerung entscheidend ist (176).

Der Mechanismus der Hemmung der Thrombozyten-Adhäsion an subendotheliales Kollagen ist nicht geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß PG I₂ in vitro in niedrigen Konzentrationen die thrombininduzierte Bildung von Rezeptoren für F VIII/ von-Willebrand-Faktor an der Membran von Thrombozyten hemmt (46).

Abbildung 3: Regulation der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen durch Prostaglandine. ↑ aggregationsfördernde, ↑↑ aggregationshemmende Vorgänge, bzw. Strukturen



4. PATIENTEN UND METHODEN

4.1 Patienten- und Kontrollpersonenauswahl

An 81 Patienten mit einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ I, die stationär in der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing in Behandlung waren, wurden Blutabnahmen durchgeführt. Die Patienten mußten zwischen 14 und 45 Jahren alt sein; Medikamente mit einer Wirkung auf Thrombozyten mußten eine Woche vor den Analysen abgesetzt sein.

Nach etwa 1 Woche wurden 15 Patienten einer Nachuntersuchung unterzogen, um einen Verlauf der zu messenden Gerinnungsparameter zu prüfen.

Als Kontrollgruppe wurden 13 gesunde Mitarbeiter des Instituts für Diabetesforschung im Alter von 22 bis 35 Jahren herangezogen.

4.2 Blutabnahmen

Alle Blutabnahmen wurden morgens am nüchternen Patienten oder Probanden durchgeführt. Das Blut wurde unter Verwendung einer großlumigen sterilen Einmalkanüle (Luer 1,10 x 30 mm) aus einer großen Armvene abgenommen, wobei auf eine möglichst atraumatische Punktion des Gefäßes geachtet wurde, um artifizielle Einflüsse auf die Gerinnungsfaktoren so gering wie möglich zu halten. Außerdem wurde das venöse Blut für die Bestimmung des β -Thromboglobulin, des Thromboxan B_2 und des 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ durch Abtropfen direkt in die jeweiligen Zentrifugenröhrchen gewonnen.

4.3 Thrombozytenaggregation (TA)

Bei der Blutabnahme wurden 20 ml venöses Blut in eine Polystyrolspritze, die bereits mit einer 3,8 %igen Na-Citrat-Lösung im Verhältnis 1:10 vorbereitet war, aufgezo-gen. Das gewonnene Blut wurde vorsichtig mit dem Antikoa-gulans vermischt und in ein Zentrifugenröhrchen aus Pla-stik überführt. Glasmaterialien durften wegen der Adhäsivi-tät der Thrombozyten nicht Verwendung finden.

In der Zentrifuge wurde bei 100 g über 15 min. bei Zimmer-temperatur plättchenreiches Plasma (PRP) als Überstand ge-wonnen und in ein neues Kunststoffröhrchen pipettiert.

Die Messung der TA erfolgte mit Hilfe eines Universal-Ag-gregometers der Firma Braun-Melsungen, das auf ein Eppen-dorf-Analog-Photometer montiert wurde. Dieses Gerät ver-einigt das von Born (12) und O'Brien (131) beschriebene nephelometrische Verfahren zur Messung der induzierten TA mit dem von Breddin (15) entwickelten Plättchenaggrega-tionstest.

Die TA wurde bei konstanter Temperatur des PRP in der Kü-vette von 37⁰ C durchgeführt. Verwendet wurde das Filter 546 nm. Es wurde darauf geachtet, die TA 30-60 min. nach der Blutabnahme zu bestimmen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

4.3.1 ADP induzierte TA

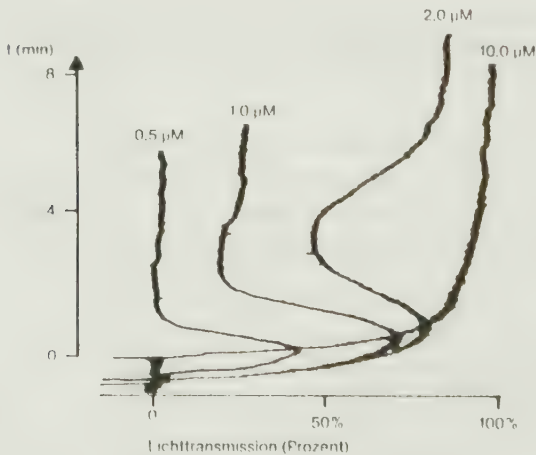
Ein ml des PRP wurde in eine vortemperierte Küvette über-führt, in den auf 37⁰ C erwärmten Heizblock des Aggregome-ters gestellt und so in den Lichtweg gebracht. Der Küvet-te war ein Magnetprüher mit 1000 U/min. beigegeben, der eine optimale Durchmischung des PRP mit dem zugegebenen

ADP (4,75 ml Barbitalpuffer 8,6 mM mit pH 7,4 + 0,25 ml 2mmol ADP der Firma Boehringer) garantierte.

Nach Abgleich des Photometers wurde der Küvette 0,5, 1,0, 2,0, 10,0 μM ADP (Endkonzentration) beigegeben, die Änderung der optischen Dichte vom Photometer gemessen und vom Schreiber über 4 min. aufgezeichnet.

Die Kurve der prozentualen Änderung der optischen Dichte wurde mit der Kurve der maximalen TA, in der Regel induziert durch 10,0 μM ADP (= 100 %), verglichen.

Abbildung 4: ADP induzierte TA nach der von Born (12) beschriebenen Methode. Die angegebenen Zahlen stellen die ADP-Endkonzentrationen im PRP dar.



Bringt man ADP in PRP ein, so setzt innerhalb von Sekunden eine TA ein. Während der ersten Phase (primäre Aggregation) ändern die Thrombozyten ihre Form: Pseudopodien werden ausgestülpt, die Plättchen schwellen an, ihre

Abbildung 5: Typische, vom Schreiber des Photometers über je 4 min. aufgezeichnete Aggregationskurven bei Zugabe von ADP. Angegeben sind jeweils die ADP-Endkonzentrationen im PRP.

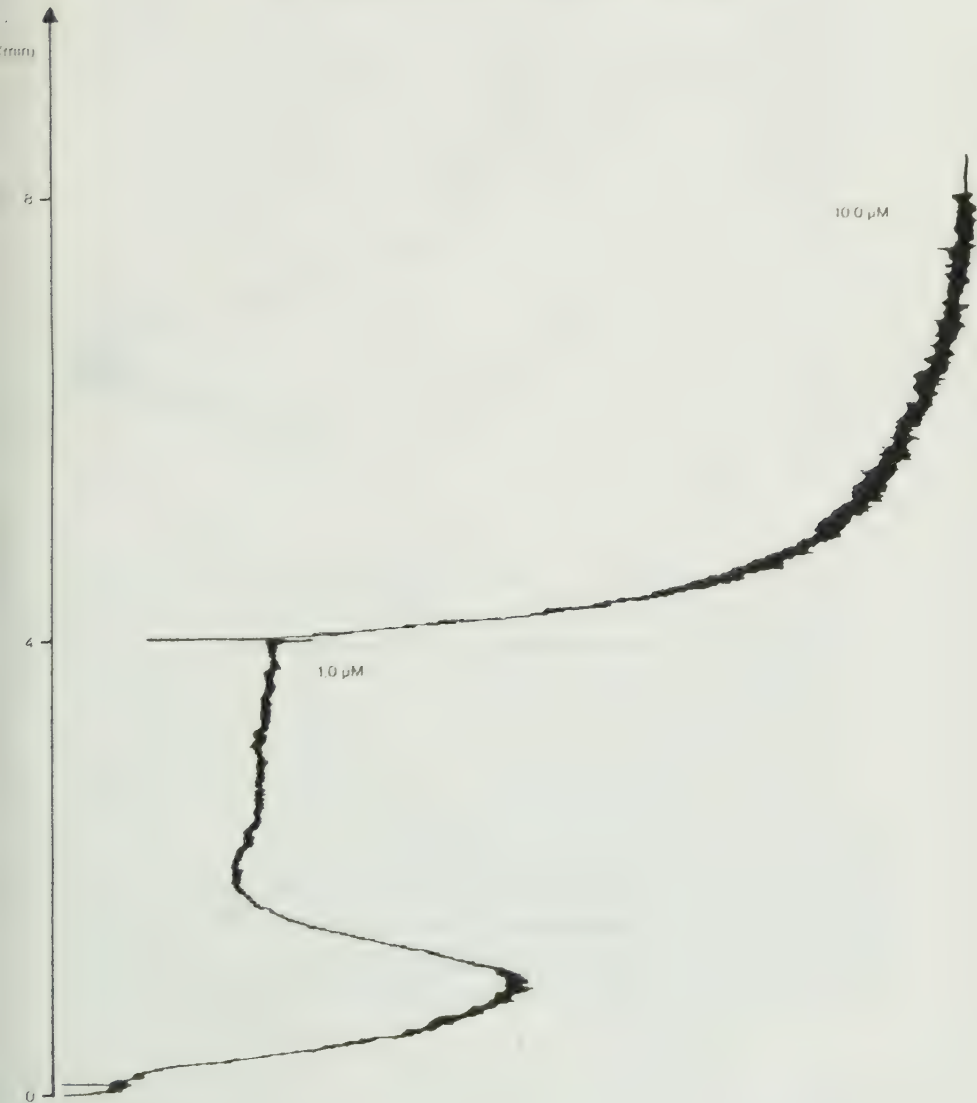


Abbildung 5: Fortsetzung

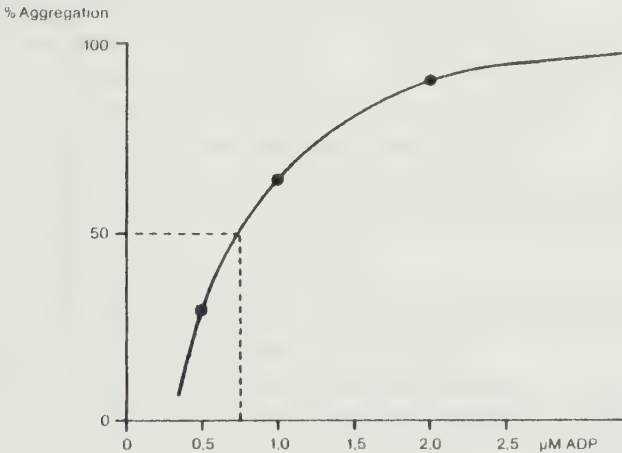


Oberfläche bekommt ein stacheliges Aussehen. Gleichzeitig wird an die Oberfläche Fibrinogen angelagert, das die Thrombozyten untereinander bindet. Dieser Vorgang ist bei niedrigen ADP-Konzentrationen (0,5, 1,0 μM) reversibel. Bei höheren Konzentrationen (2,0, 5,0, 10,0 μM) laufen zunächst die selben Vorgänge ab, zusätzlich bewirkt eine verstärkte Freisetzung von Plättcheninhaltsstoffen eine Intensivierung der TA (sekundäre Aggregation/2. TA-Welle) (166).

Als zu vergleichende Gerinnungsparameter zwischen den Patienten und Probanden wurde der Wert der "50%-Aggregation" oder "ADP-Schwellenkonzentration" zeichnerisch über eine Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Dieser Wert der ADP-

Schwellenkonzentration wurde in μM ADP (Endkonzentration) angegeben.

Abbildung 6: Zeichnerische Ermittlung der "50%-Aggregation" oder "ADP-Schwellenkonzentration". Die im Beispiel dargestellten Punkte geben die prozentuale Veränderung der optischen Dichte an, die durch die zugegebenen ADP-Konzentrationen im PRP nach 4 min. erreicht wurde.



4.3.2 Spontane TA

Ein ml PRP wurde in eine Scheibenküvette pipettiert, die im Strahlengang des Photometers mit 20 U/min. bei 37°C rotierte. Die Änderung der optischen Dichte des PRP durch Aggregation der Thrombozyten wurde über einen Zeitraum von 10 min. erfaßt.

Entscheidend für die Auslösung der spontanen TA (PAT III - Test nach Breddin) (15) ist der während der Rotation erfolgende Anstieg des Plasma-pH durch Austritt von CO_2 . Dieser Vorgang ist die entscheidende Voraussetzung für die spontane TA, jedoch nicht deren Ursache. Das Ausmaß des pH-Anstiegs ist in aggregierenden und nicht aggregierenden Plasmen gleich groß, umgekehrt hängt die Stärke der Aggregation nicht vom Ausmaß des pH-Anstiegs ab (15).

Durch Anlegen einer Tangente an die aufgezeichnete Aggregationskurve ergaben sich die Winkel α_1 und α_2 .

Winkel α_1 , gebildet aus der Waagrechten und der Tangente zur beim Start der Rotation relativ flach verlaufenden Transmissionskurve bis zum Beginn der maximalen Aggregation, entspricht der "primären Aggregation".

Winkel α_2 , gebildet aus der Waagrechten und der Tangente zum steilsten Teil des Kurvenabfalls, entspricht der "sekundären Aggregation".

Abbildung 7: Bestimmung der spontanen TA nach Breddin (15). Die Winkel α_1 und α_2 werden durch Anlegen einer Tangente an die Aggregationskurve erhalten.

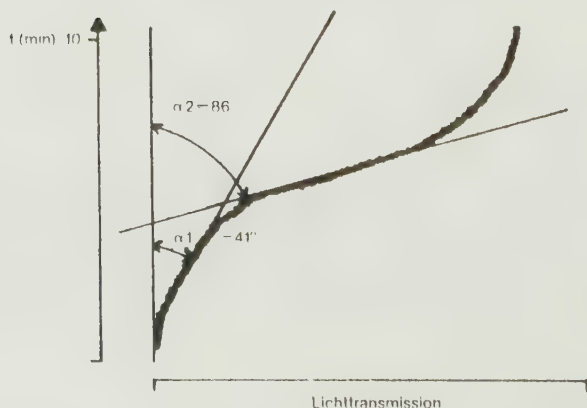


Abbildung 8: Typische Kurven für die Bestimmung der spontanen TA.

Obere Kurve "negativ", untere Kurve "positiv".



Alle Kurven, die völlig gerade verlaufen und Kurven mit einem Winkel α_1 oder α_2 unter 40° wurden als "negativ" bewertet, die Kurven mit einer Aggregationssteigerung, d.h. mit einem Winkel α_1 oder α_2 über 40° , wurden als für die spontane TA "positiv" bezeichnet.

4.4 Bestimmung des Faktors VIII assoziierten Antigens

Nach der Blutabnahme, wobei als Antikoagulans eine 3,8 %ige NA-Citrat-Lösung im Verhältnis 1:10 verwendet wurde, wurde durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1000 g Plasma gewonnen und bis zur Analyse bei -20° C aufbewahrt.

Zur quantitativen Bestimmung des F VIII R : Ag wurde Clo-timmun-AHG-assoziertes Protein der Firma Behring Institut im Elektro-Immunoassay nach Laurell (103) benützt. Unter Verwendung von Barbitalpuffer, pH 8,6, $\mu = 0,02$ (41,2 g Barbitat-Natrium und 8 g Barbitat mit destilliertem Wasser auf 10 Liter auffüllen) wurde eine 1 %ige Agarose-Lösung hergestellt. Bei 56° C wurde das Antiserum zugemischt. Das Agarosegel und das Antiserum wurden auf eine vorgewärmte Glasplatte gegeben.

Mit einer Wasserstrahlpumpe wurden kreisförmige Auftragsstellen in das erstarrte Gel gestanzt, in die 5 μ l der mit einer Na-Cl-Lösung 1:4 verdünnten Plasmaproben aufgetragen wurden.

Zur Erstellung der Bezugskurve wurde ein Plasma von einer Normalperson in den Verdünnungen 1:8, 1:4, 1:2, 1:1 (unverdünnt) eingesetzt.

Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 16-18 Stunden mit 2 V/cm unter Wasserkühlung. Zur Auswertung wurden die Platten mit destilliertem Wasser ausgewaschen und mit der Färbelösung 50 g Coomassie Brilliant Blue R der Firma Ed-

ward Gurr (bestehend aus 4,5 l Äthanol 96 %, 1,0 l Eisesig, 4,5 l aqua dest.) ca. 15 min. angefärbt. Unter Sichtkontrolle wurde solange gefärbt, bis die Präzipitate deutlich erkennbar waren. Die Färbelösung wurde durch Eintauchen in die Entfärbelösung (Äthanol-Entfärber) abgewaschen.

Die Präzipitate der verdünnten Plasmareihe der Normalperson wurde zur Erstellung einer Standardkurve verwendet, wobei das Resultat der unverdünnt aufgetragenen Probe als 100 % F VIII R : Ag angesetzt wurde. Die Ergebnisse der Patienten- und Probandenproben wurden unter Berücksichtigung der Verdünnung hierzu in Bezug gesetzt und ebenfalls in Prozent angegeben.

4.5 β -Thromboglobulin

Bei der Gewinnung des Plasmas wurde darauf geachtet, daß eine β -TG-Freisetzung von der Blutabnahme bis zur Plasmapräparation so weit wie möglich unterdrückt wurde, um nur den tatsächlichen in vivo-Plasmaspiegel an β -TG zu messen, und um artifiziell erhöhte β -TG-Spiegel zu vermeiden.

Nach einer möglichst atraumatischen Venenpunktion wurden 2,5 ml Blut durch Abtropfen aus der großlumigen Einmalkanüle direkt in das vorgekühlte, mit Na-EDTA, Prostaglandin E_1 und Theophyllin als Antikoagulantien versehene Proberöhrchen (Bestandteil des β -TG ^{125}J RIA Kit der Firma Amersham) gewonnen. Nach einem vorsichtigen Durchmischen des abgenommenen Blutes mit den Antikoagulantien im Röhrchen, wurde dieses sofort in ein Eisbad überführt, und bei $2^{\circ}C$ und 2000 g 30 min. zentrifugiert. Aus der oberen Phase des Überstandes wurden 0,5 ml Plasma abgehoben und bis zur Analyse bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

Die radioimmunologische Bestimmung des β -TG erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits der Firma Amersham. Die Methode des RIA ist eine Modifikation des von Ludlam und Cash (106) empfohlenen Vorgehens und beruht auf der Kompetition zwisch β -TG und Jod- 125 -markiertem β -TG um eine begrenzte Anzahl von Bindungsplätzen an einem β -TG spezifischen Antikörper.

Im RIA verwendetes Material:

- a) Antikörper: β -TG-Antiserum
- b) Tracer: β -TG (125 J)
- c) Standard: Humanes β -TG in 5 Konzentrationen
- d) Trennmethode: Ammoniumsulfatlösung

Tabelle 1: Pipettierschema des β -TG (125 J) RIA Kit; Alle Volumina sind in μ l angegeben.

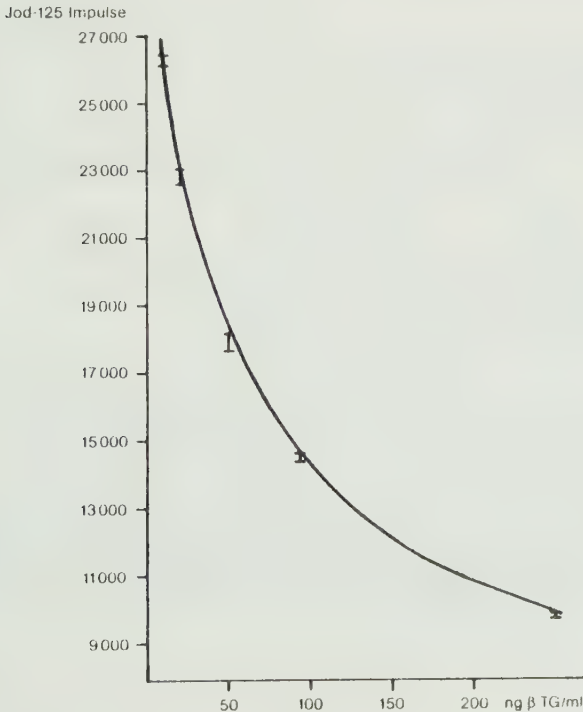
	Standards (ng/ml)					Plasma- proben
	10	20	50	100	225	
Teströhrchen	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10	11/12 usw.
Standards	50	50	50	50	50	-
Plasmaproben	-	-	-	-	-	50
β -TG (125 J)	200	200	200	200	200	200
β -TG-Antiserum	200	200	200	200	200	200
Ammoniumsulfatlösung	500	500	500	500	500	500

Je 50 μ l der mitgelieferten Standards und je 50 μ l der Plasmaproben wurden als Doppelbestimmungen in Teströhrchen pipettiert; 200 μ l β -TG (125 J)-Lösung und 200 μ l β -TG Antiserum wurden zugegeben und gut mit dem Plasma bzw. Standard durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde das an den Antikörper

gebundene β -TG (^{125}J) durch Zugabe von 500 μl Ammoniumsulfatlösung abgetrennt. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 1000 g und Dekantieren des Überstandes wurde die Radioaktivität des Präzipitates in einem Gammacounter gemessen. Die Menge von β -TG (^{125}J), die an den Antikörper gebunden wird, ist der Konzentration von unmarkiertem β -TG in der Probe umgekehrt proportional.

Der β -TG Gehalt der unbekannten Proben wurde durch graphische Interpolation aus der Standardkurve ermittelt, die unter Verwendung der mitgelieferten Standards erstellt wurde.

Abbildung 9: Typische Standardkurve zur Ermittlung des β -TG Gehalts der Plasmaproben



4.6 Thromboxan B₂

Da TX A₂ unter physiologischen Bedingungen (ph 7,4, 37° C) nur eine Halbwertszeit von ca. 30 s besitzt (68), ist es äußerst schwierig zu bestimmen. Dagegen ist die Messung seines stabilen Metaboliten, des TX B₂, einfacher und ein guter Hinweis für die TX A₂-Menge.

Bei 51 Patienten wurde durch Abtropfen aus der weitleumigen Einmalkanüle in ein Zentrifugenröhrchen 10 ml Blut gewonnen und sofort in ein Eisbad überführt. Als Antikoagulantien dienten 500 µl EDTA (Titriplex III der Firma Merck, 0,2606 g + 10 ml H₂O, 7 mmolar) und 50 µl Aspisol der Firma Bayer (1 g aufgelöste Trockensubstanz in 5 ml H₂O). (= "Plasmaspiegel")

Nach vorsichtigem Durchmischen mit der antikoagulierenden Lösung wurden die Proben 15 min. bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand abgehoben und bis zur Analyse bei -20° C aufbewahrt.

Außerdem wurde bei 8 Patienten und bei den Kontrollpersonen 5 ml Blut ohne Antikoagulans auf die gleiche Weise abgenommen. Dieses Blut beließ man 2 Stunden zur Gerinnung in einem Wasserbad bei 37° C, um es anschließend nach dem oben genannten Verfahren zu zentrifugieren und bis zur Analyse aufzubewahren. (= "Vollblutwert")

Weiterhin wurde bei 8 Patienten und bei den Kontrollpersonen je 1 ml PRP, das bei der Bestimmung der TA gewonnen wurde mit 0,5 µg Kollagen/ml (Kollagenreagens Horm der Firma Horm) und 2,5 µg Kollagen/ml zur Aggregation bei 37° C angeregt. Nach 10 min. wurde die TA mit 10 µl Indometacin gestoppt, die Thrombozyten durch 15-minütige Zentrifugation bei 2000 g entfernt und der Überstand ebenfalls bis zur Analyse bei -20° C aufbewahrt. (= "0,5-" bzw. "2,5 µg Kollagenwert")

Je 1 ml der Plasmaproben wurde durch Zugabe von 50 μ l 2N HCL auf einen pH 3-3,5 angesäuert und 10 Minuten bei 1000 g bei 4⁰ C zentrifugiert um eventuell denaturierte Proteine abzutrennen.

Die Extraktion des TX B₂ erfolgte nach dem Vorgehen von Powell (143) und Seiss (165) mit C₁₈- und Si-Bond Elut-Säulen der Firma Analytichem International, wobei ein Vac Elut-System (Vakuumfiltrationssystem) der gleichen Firma verwendet wurde.

Die C₁₈-Säulen wurden mit 2 ml MeOH und 2 ml destilliertem Wasser, pH 3,5 ausgewaschen. Dieser und alle folgenden wasch- bzw. Lösungsvorgänge erfolgte unter Vakuum mit einer Fließrate von nicht mehr als 1 ml/min.

Nachdem 800 μ l der Plasmaprobe auf die Säule aufgetragen und durchgefiltert wurde, wurde die Säule mit 2 ml destilliertem Wasser, pH 3,5, 2 ml 15 %igem MeOH und 2 ml Petroleum Ether nachgewaschen.

Zur Überführung des TX B₂ aus der C₁₈-Säule direkt in eine vorbereitete Si-Säule und zur Trennung des TX B₂ von anderen mehr oder weniger polaren Interferenzen wurden folgende Lösungen mit ansteigender Polarität verwendet:

- | | | | |
|---------|------|--------------------|-----------|
| Lösung: | I. | Benzol: EtOAC | -80:20 |
| | II. | Benzol: EtOAC | -60:40 |
| | III. | Benzol: EtOAC:MeOH | -60:40:2 |
| | IV. | Benzol: EtOAC:MeOH | -60:40:10 |
| | V. | Benzol: EtOAC:MeOH | -60:40:30 |

Die Si-Säule wurde mit 5 ml Lösung I vorbereitet. Mit Hilfe eines Adapters wurde die C₁₈-Säule direkt auf die gewaschene Si-Säule aufgesetzt.

TX B₂ wurde aus der C₁₈-Säule mit 1 ml EtOAC direkt in die Si-Säule überführt. Die Si-Säule wurde mit je 1 ml Lösung I, II, III und IV nachgewaschen. TX B₂ wurde aus der

Si-Säule mit 3 ml Lösung V in ein silikonisiertes Glasröhrchen gebracht. Glasmaterialien ohne Silikonschicht mußten wegen der Adhäsivität des Prostaglandins vermieden werden.

Die Wiederfindungsrate dieses Plasma-Extraktionsverfahrens wurde überprüft. Dabei wurden 100 µl des ^{125}J -markierten-TX B₂ (Bestandteil des RIA-Kits der Firma New England Nuclear), dessen Radioaktivität gemessen und als 100 % angesetzt wurde, anstelle der Plasmaproben in dem oben beschriebenen Extraktionsverfahren eingesetzt. Die bei jedem Schritt verlorene Radioaktivität wurde bestimmt. Außerdem wurden die im Extrakt am Ende des Verfahrens verbliebenen counts ermittelt und in Prozent zur eingesetzten Menge angegeben.

Der Extrakt wurde unter N₂ bei 56° C verdampft und mit dem RIA-Kit mitgeliefertem Assay-Puffer (s.u.) auf 500 µl aufgefüllt. Nach einer gründlichen Durchmischung und einer Inkubationszeit von 30 min. wurde die Lösung durch ein 0,22 µm großes Millex Filter gefiltert.

TX B₂ ist mittels RIA im Plasma nachzuweisen (44/61) und erfolgte durch einen kommerziellen Kit der Firma New England Nuclear. Das Prinzip des RIAs beruht auf einer kompetitiven Bindung, bei der ein radioaktiv markiertes Antigen (^{125}J) mit einem nicht radioaktiven Antigen um eine bestimmte Anzahl von Antikörperbindungsstellen konkurriert. Wenn unmarkiertes Antigen aus dem Standard oder den Proben und eine bestimmte Menge Tracer (markiertes Antigen) mit einer konstanten und limitierten Menge von Antikörpern zur Reaktion gebracht werden, so ist die Menge von Tracer, die an den Antikörper gebunden ist, der Kon-

zentration von unmarkiertem Antigen in der Probe umgekehrt proportional.

Im RIA verwendetes Material:

- a) Antikörper: Kaninchen-AK
- b) Assay-Puffer: NaCl (0,9 %), EDTA (0,01 M), Rindergamma-Globulin (0,3 %), Triton-X-100 (0,005 %), Natriumazid (0,05 %) in 50 mM Phosphat-Puffer, pH 6,8
- c) Tracer: (^{125}J)-TX B₂
- d) Standard: Humanes TX B₂-Konzentrat
- e) Trennmethode: 16 % Polyethylenglykol (PEG 6000)

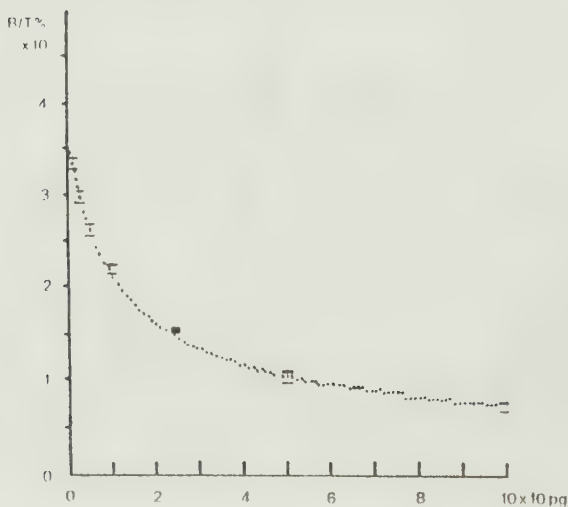
Aus dem Standard-Konzentrat wurden mittels Verdünnungsreihe acht verschiedene Standard-Konzentrationen von 5000 bis 10 pg/ml TX B₂ hergestellt. Zusammen mit dem Null-Standard wurden sieben Standard-Konzentrationen im Assay bestimmt.

Tabelle 2: Pipettierschema des TX B₂ (^{125}J) RIA Kit; Alle Volumina sind in µl angegeben.

	Total- counts	Null- Stan- dards	Standards 10-1000 pg/ml	Plasma- proben
Teströhrchen	1/2	3/4	5 - 18	19/20 usw.
Assay-Puffer	-	100	-	-
Standards	-	-	100	-
Plasmaproben	-	-	-	100
TX B ₂ (^{125}J)	100	100	100	100
TX B ₂ -Antiserum	-	100	100	100
Polyethylenglykollsg.	-	1000	1000	1000

Als Doppelbestimmungen wurden 100 μ l der angefertigten, gelösten Standardreihe und 100 μ l der Plasmaproben in Proberöhrchen pipettiert. 100 μ l Tracer-Lösung wurde zugegeben und auf dem Schüttelmixer gemischt. 100 μ l Antiserum wurde dazugebracht und ebenfalls gut durchgemischt. Die darauf folgende Inkubationszeit betrug 18 Stunden bei 2⁰ C. Die Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes vom freien Antigen erfolgte durch einen Niederschlag des Antikörper-gebundenen Tracers durch Zugabe von 1 ml einer mitgelieferten Polyethylen-Glykol-Lösung in der Anwesenheit des Trägerimmunglobulins. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. bei 2⁰ C und einer Zentrifugation bei 2000 g über 30 min. ebenfalls bei 2⁰ C wurde der Überstand, der

Abbildung 10: Typische Standardkurve zur Ermittlung des TX B₂-Gehalts der Plasmaproben



das ungebundene Antigen enthielt, dekantiert und die Radioaktivität des Präzipitates in einem Gammacounter gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch einen dem Gammacounter angeschlossenen Rechner, der eine Standardkurve aus dem Quotienten aus gebundener Radioaktivität der Standards (B) und der prozentualen Totalaktivität T (nur 100 μ l Tracer im Röhrchen) in Bezug zur Konzentration der Standards in pg erstellte.

Der TX B₂-Gehalt pro ml der unbekannten Plasmaproben wurde unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungen bei dem Extraktionsvorgang durch rechnerische Interpolation aus der erstellten Standardkurve ermittelt.

4.7 6-keto-Prostaglandin F_{1 α}

PG I₂ besitzt unter physiologischen Bedingungen eine sehr kurze Halbwertszeit (21). Aus diesem Grunde wurde sein stabiler Metabolit 6-keto-PG F_{1 α} als Hinweis auf die PG I₂-Menge bestimmt.

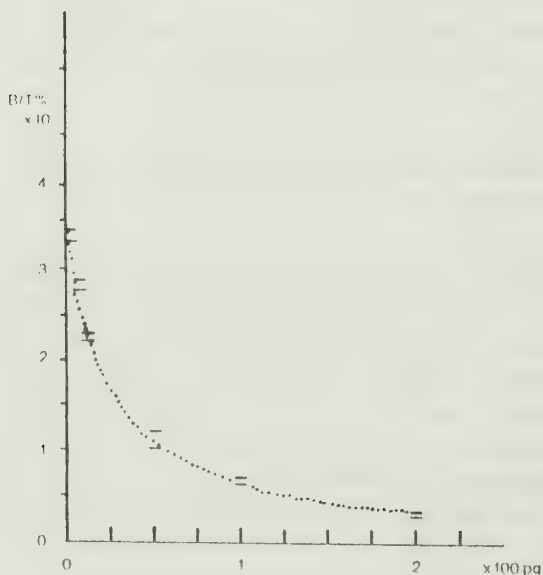
Die Blutabnahmen und die Vorbereitung der Proben erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Bestimmung des TX B₂.

Die Extraktion des 6-keto-PG F_{1 α} (143/165) geschah nach dem gleichen Prinzip wie die des TX B₂ mit dem Unterschied, daß, nachdem auf die vorbereitete C₁₈-Säule 800 μ l der Plasmaprobe aufgetragen wurde, diese mit destilliertem Wasser, pH 3,0, 2 ml 10 %igem MeOH und 2 ml Benzol nachgewaschen wurde. Ein weiterer Unterschied bestand darin, 6-keto-PG F_{1 α} mit 5 ml Lösung V (siehe Extraktion des TX B₂) aus der Si-Säule in ein silikonisiertes Glas auszuwaschen.

Die Wiederfindungsrate des Extraktionsverfahrens wurde ebenfalls, wie unter 4.6 beschrieben, überprüft.

Zahlreiche RIAs zur Bestimmung von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ wurden beschrieben (139/159). Die quantitative Analyse von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ wurde ebenfalls radioimmunologisch mit einem kommerziellen Kit der Firma New England Nuclear durchgeführt. Das in diesem RIA verwendete Material entspricht bis auf den Tracer (^{125}J)-keto-PG $F_{1\alpha}$ und dem humanen 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Standard dem oben beschriebenen TX B_2 -Kits; das Pipettierschema ist identisch.

Abbildung 11: Typische Standardkurve zur Ermittlung des 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Gehalts der Plasmaproben



Aus dem Standard-Konzentrat wurden mittels Verdünnungsreihe acht verschiedene Standard-Konzentrationen von 5000 bis 20 pg/ml 6-keto-PG F_{1α} hergestellt und wie oben beschrieben im Assay bestimmt.

Die Messung der Radioaktivität der Präzipitate und die Auswertung erfolgte ebenfalls wie zur Bestimmung des TX B₂.

4.8 Weitere klinisch-chemische Analysen

Diese Analysen wurden im zentralen Labor des Krankenhauses München-Schwabing im Zuge der klinisch-chemischen Routineuntersuchungen erstellt.

Blutglucose, Serumcholesterin und -triglyceride wurden enzymatisch nach Standardmethoden (Boehringer Mannheim Kit) bestimmt (152/178).

Hämoglobin A_{1c} (Hb A_{1c}) wurde mit Hilfe des "Column Tests" der Firma Bio-Rad ermittelt (79).

4.9 Ermittlung und Klassifikation der Retinopathie

Im Rahmen der konsiliarischen Augenuntersuchung der stationär behandelten Diabetiker wurden Retinopathien ophthalmologisch ermittelt und nach Ballantyne klassifiziert (2).

Stadium I bedeutet einzelne Mikroaneurysmen, II zahlreiche Mikroaneurysmen, harte und weiche Exsudate und retinale Blutungen, III Neovaskularisationen und IV Glaskörperblutungen, Narbenstränge und Ablatio retinae.

4.10 Statistische Prüfverfahren

Es wurden lineare Korrelationsrechnungen zur Bestimmung des Korrelationskoeffizienten r und der Regressionsgeraden durchgeführt.

Zur Berechnung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der Student-t-Test (zweiseitige Fragestellung) für unverbundene Stichproben angewendet. Bei den Patienten, die einer Nachuntersuchung unterzogen wurden, erfolgte die Berechnung des Verlaufs der Parameter mit Hilfe des Student-t-Tests für verbundene Stichproben. Für Signifikanz-Unterschiede bei diskreten Parametern wurde eine Chi-Quadrat-Analyse nach dem Vier-Felder-Test gerechnet.

Angegeben wurde der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung S.E.M. (standard error of mean).

5. ERGEBNISSE

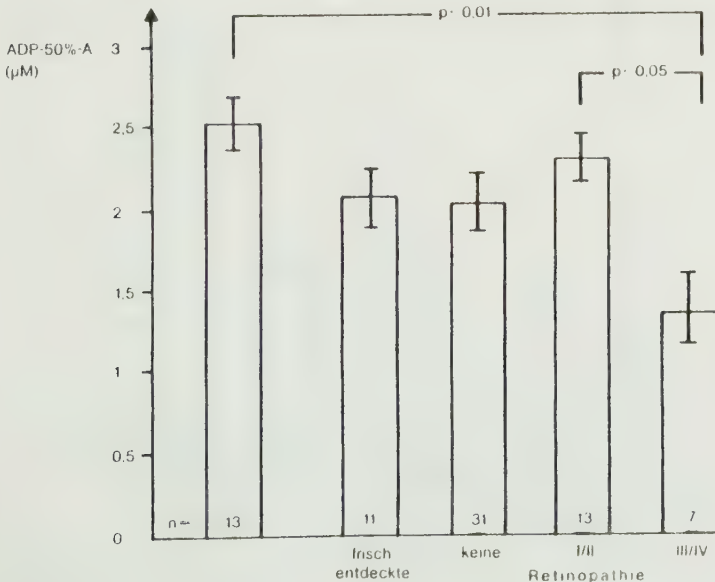
5.1 Thrombozytenaggregation (TA)

5.1.1 ADP induzierte TA

Die Schwellenkonzentration (50 % - A) betrug bei den 13 Kontrollpersonen (K) $2,52 \pm 0,22 \mu\text{M ADP}$ ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$), bei den frisch entdeckten Diabetikern (D) ($n = 11$) $2,03 \pm 0,35 \mu\text{M ADP}$, bei den D ohne Retinopathia diabetica (R.d.) ($n = 31$) $2,01 \pm 0,18 \mu\text{M ADP}$, bei den D mit R.d. Stadium I/II ($n = 13$) $2,23 \pm 0,27 \mu\text{M ADP}$ und bei den D mit R.d. Stadium III/IV ($n = 7$) $1,29 \pm 0,41 \mu\text{M ADP}$.

Die Mittelwerte der D mit R.d. III/IV unterschieden sich hochsignifikant ($p < 0,01$) von den K und signifikant ($p < 0,05$) von den D mit R.d. I/II.

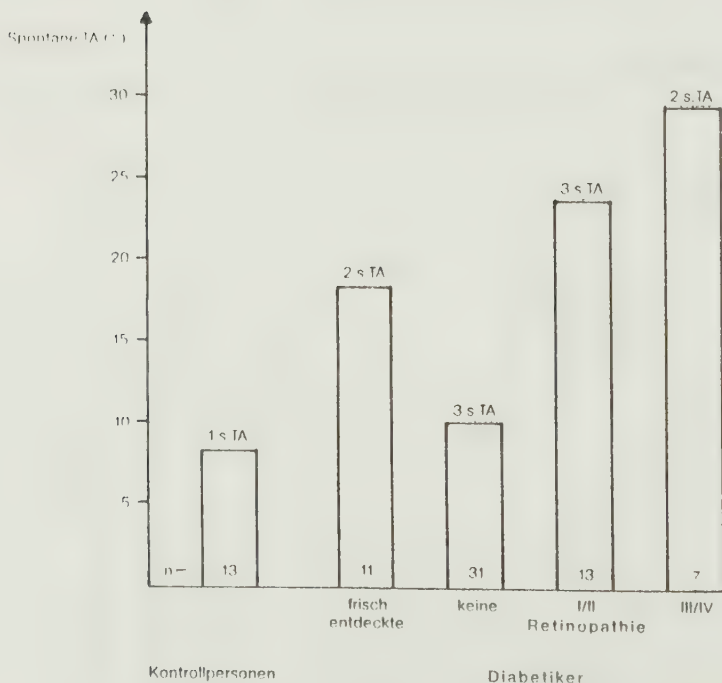
Abbildung 12: ADP induzierte Thrombozytenaggregation bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)



5.1.2 Spontane TA

Bei den K (n = 13) wurde eine spontane TA beobachtet (= 8 %), bei den frisch entdeckten D (n = 11) 2 spontane TA (= 18 %), bei den D ohne R.d. (n = 31) 3 spontane TA (= 10 %), bei den D mit R.d. I/II (n = 13) 3 spontane TA (= 23 %) und bei den D mit R.d. III/IV (n = 7) 2 spontane TA (= 29 %).

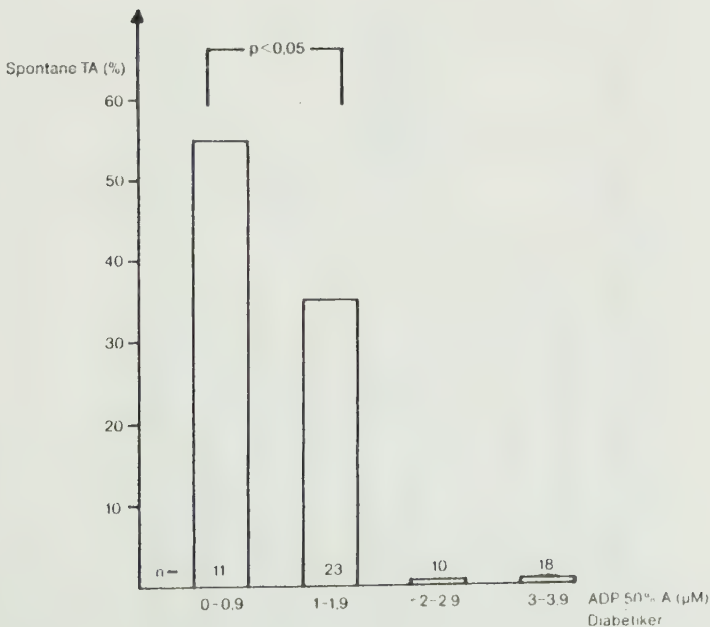
Abbildung 13: Spontane Thrombozytenaggregation bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen (in % bezogen auf n)



Wurde das Auftreten der ADP-Schwellenkonzentration bei allen Diabetikern in Gruppen 0-0,9 μM ADP ($n = 11$), 1-1,9 μM ADP ($n = 23$), 2-2,9 μM ADP ($n = 10$), 3-3,9 μM ADP ($n = 18$) eingeteilt, so zeigte sich, daß 6 spontane TA (= 55 %) in der Gruppe 0-0,9 μM ADP und 4 spontane TA (= 17 %) in der Gruppe 1-1,9 μM ADP auftraten. In den restlichen Gruppen wurden keine spontanen TA beobachtet.

Die spontanen TA in der Gruppe 0-0,9 μM ADP waren signifikant häufiger (Chi-Quadrat-Wert = 4,95 / $p < 0,05$) als in der Gruppe 1-1,9 μM ADP.

Abbildung 14: Spontane Thrombozytenaggregation im Verhältnis zur ADP-Schwellenkonzentration (in % bezogen auf n)

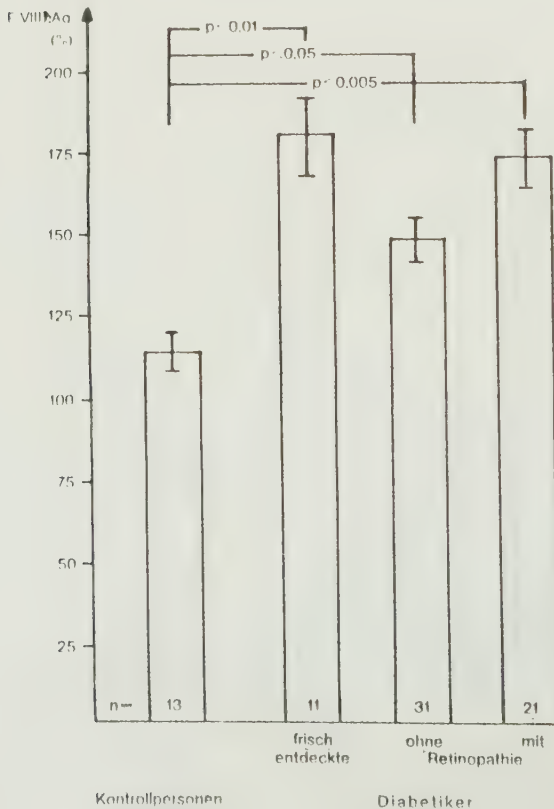


5.2 Faktor VIII assoziiertes Antigen

Die Mittelwerte des F VIII R : Ag betrugen bei den K (n = 13) $110 \pm 9 \%$ ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$), bei den frisch entdeckten D (n = 11) $178 \pm 22 \%$, bei den D ohne R.d. (n = 31) $148 \pm 10 \%$ und bei den D mit R.d. (n = 21) $172 \pm 13 \%$.

Die Werte der K unterschieden sich hochsignifikant ($p < 0,01$) von den frisch entdeckten D, signifikant ($p < 0,05$) von den D ohne R.d. und hochsignifikant ($p < 0,005$) von den D mit R.d.

Abbildung 15: F VIII assoziiertes Antigen bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$)

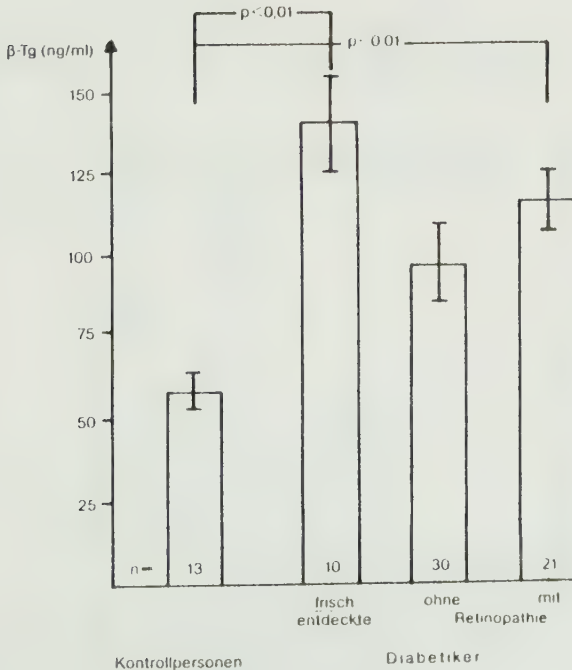


5.3 β -Thromboglobulin

Die Mittelwerte der Plasma- β -TG-Spiegel betrugen bei den K ($n = 13$) $58,2 \pm 13,6$ ng/ml ($\bar{x} \pm$ S.E.M.), bei den frisch entdeckten D ($n = 10$) $144,0 \pm 28,9$ ng/ml, bei den D ohne R.d. ($n = 30$) $97,7 \pm 15,9$ ng/ml und bei den D mit R.d. ($n = 21$) $121,9 \pm 16,7$ ng/ml.

Der Unterschied zwischen den Gruppen K und frisch entdeckten D war hochsignifikant ($p < 0,01$), ebenso zwischen K und D mit R.d. ($p < 0,01$).

Abbildung 16: Plasma- β -TG-Spiegel bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)



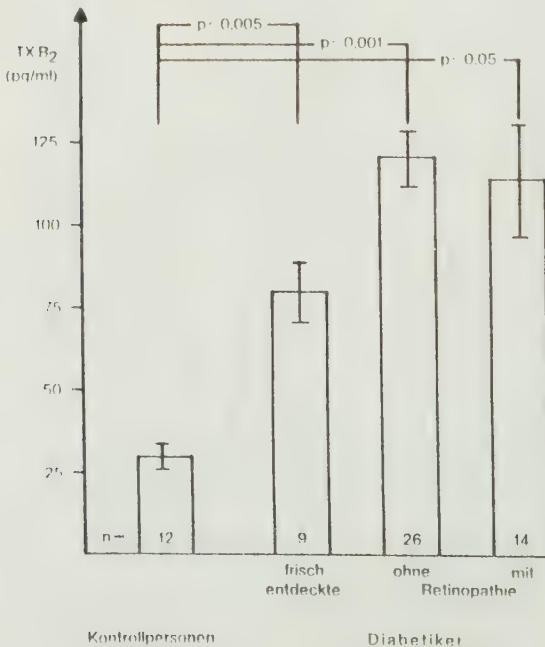
5.4 Thromboxan B₂

Da die Wiederfindungsrate des Plasma-Extraktionsverfahrens für TX B₂ bei 92 % lag, konnte eine Verlustberechnung vernachlässigt werden.

5.4.1 "Plasmaspiegel"

Bei 51 D und bei 12 K wurden die "Plasmaspiegel" von TX B₂ bestimmt. Die Mittelwerte bei den K betrugen $27,8 \pm 6,0$ pg/ml ($\bar{x} \pm$ S.E.M.), bei den frisch entdeckten D (n = 9) $76,2 \pm 15,3$ pg/ml, bei den D ohne R.d. (n = 26) $121,5 \pm 19,6$ pg/ml und bei den D mit R.d. (n = 16) $115,4 \pm 31,6$ pg/ml.

Abbildung 17: Thromboxan B₂ "Plasmaspiegel" bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)



Die Unterschiede zwischen der Gruppe K und frisch entdeckten D ($p < 0,005$) und zwischen K und D ohne R.d. ($p < 0,001$) waren hochsignifikant, zwischen K und D mit R.d. ($p < 0,05$) signifikant.

5.4.2 "Vollblutwert"

Die Mittelwerte bei den K ($n = 13$) betrugen $2848,5 \pm 212,9$ pg/ml, bei den D ($n = 8$) $2565,5 \pm 266,2$ pg/ml.

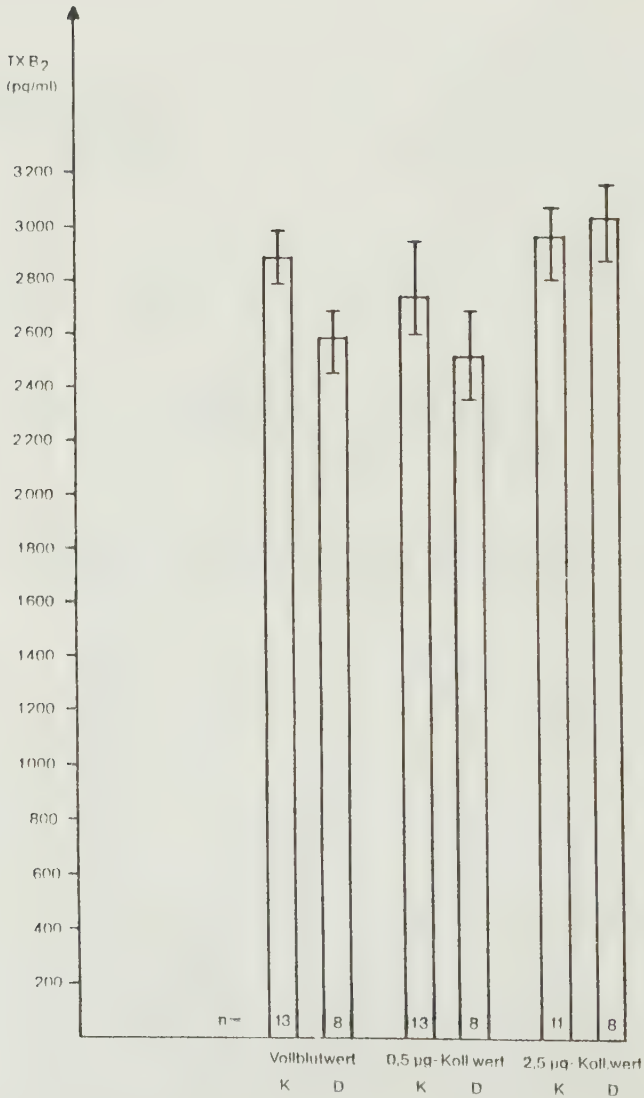
5.4.3 "0,5-" und "2,5 µg Kollagenwert"

Die Mittelwerte bei der Bestimmung des "0,5 µg Kollagenwerts" betrugen bei den K ($n = 13$) $2725,8 \pm 314,5$ pg/ml, bei den D ($n = 8$) $2496,6 \pm 354,1$ pg/ml.

Die Mittelwerte beim "2,5 µg Kollagenwert" betrugen bei den K ($n = 11$) $2938,1 \pm 238,2$ pg/ml, bei den D ($n = 8$) $3012,5 \pm 355,8$ pg/ml.

Bei den Mittelwerten der "Vollblut-", "0,5-" und "2,5 µg Kollagenwerte" ergaben sich zwischen K und D keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 18: Thromboxan B_2 "Vollblut-", "0,5-" und "2,5 μg Kollagenwerte" bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm S.E.M.$)



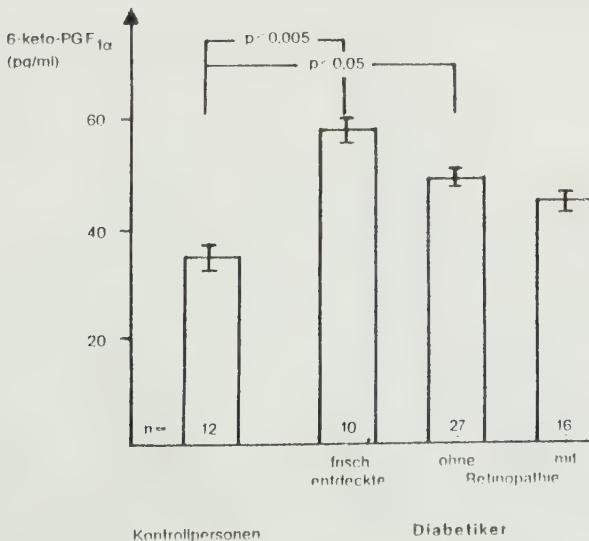
5.5 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$

Die Wiederfindungsrate des Extraktionsverfahrens betrug bei 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ 83 %. Eine Verlustrechnung wurde nicht durchgeführt.

5.5.1 "Plasmaspiegel"

Bei 53 D und bei 12 K wurden die "Plasmaspiegel" von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ bestimmt. Die Mittelwerte bei den K betrugen $34,3 \pm 4,4$ pg/ml ($\bar{x} \pm$ S.E.M.), bei den frisch entdeckten D ($n = 10$) $56,9 \pm 5,6$ pg/ml, bei den D ohne R.d. ($n = 27$) $48,0 \pm 3,0$ pg/ml und bei den D mit R.d. ($n = 16$) $44,5 \pm 3,3$ pg/ml.

Abbildung 19: 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ "Plasmaspiegel" bei insulinpflichtigen Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)



Die Werte der K unterschieden sich hochsignifikant ($p < 0,005$) von den frisch entdeckten D und signifikant von den D ohne R.d. ($p < 0,05$).

5.5.2 "Vollblutwert"

Die Mittelwerte bei den K ($n = 13$) betrugen $1025,1 \pm 232,0$ pg/ml, bei den D ($n = 8$) $814,8 \pm 165,9$ pg/ml.

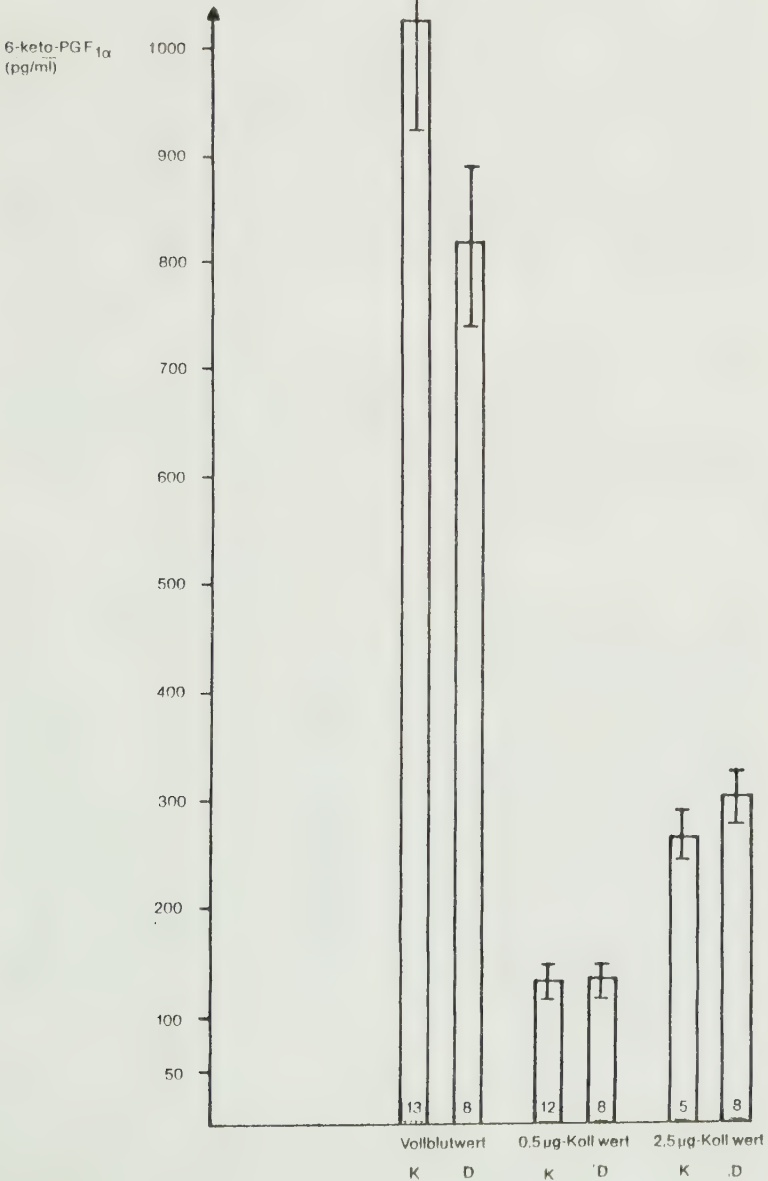
5.5.3 "0,5-" und "2,5 μ g Kollagenwert"

Die Mittelwerte bei der Bestimmung des "0,5 μ g Kollagenwerts" betrugen bei den K ($n = 12$) $127,6 \pm 16,3$ pg/ml, bei den D ($n = 8$) $128,8 \pm 18,5$ pg/ml.

Die Mittelwerte beim "2,5 μ g Kollagenwert" betrugen bei den K ($n = 5$) $157,4 \pm 38,3$ pg/ml, bei den D ($n = 8$) $200,5 \pm 39,8$ pg/ml.

Bei den Mittelwerten der "Vollblut-", "0,5-" und "2,5 μ g Kollagenwerte" ergaben sich zwischen K und D keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 20: 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ "Vollblut-",
"0,5-" und "2,5 μ g Kollagenwerte" bei insu-
linpflichtigen Diabetikern und Kontrollper-
sonen ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)



5.6 Korrelationsrechnungen

5.6.1 Korrelationen mit ADP-Schwellenkonzentration

Bei den Korrelationsberechnungen wurden der ADP-Schwellenkonzentration als Ausdruck der TA die variablen Parameter Alter, Diabetes-Dauer, Hb A_{1c}, Blutglucose, Serum-Cholesterin, -Triglyceride, β -TG, F VIII R : Ag, TX B₂ und 6-keto-PG F_{1 α} gegenübergestellt.

Hierbei wurde als einziges signifikantes Ergebnis die Korrelation von TA zu Cholesterin ($r = -0,27$; $p < 0,05$) erhalten.

Tabelle 3: Korrelation von ADP induzierter Thrombozytenaggregation (Schwellenkonzentration) mit Alter, Diabetes-Dauer, den aktuellen Blutwerten von Glucose, Hb A_{1c} und Lipiden sowie den Gerinnungsparametern β -TG, F VIII R : Ag, TX B₂ und 6-keto-PG F_{1 α}

	Diabetiker	n	Diabetiker und Kontrollpersonen	n
Alter	$r = -0,18$	62	$r = -0,15$	75
Diabetes-Dauer	$r = -0,19$	62	-	
Hb A _{1c}	$r = -0,04$	58	-	
Blutglucose	$r = -0,01$	61	-	
Cholesterin	$r = -0,27^*$	58	-	
Triglyceride	$r = -0,27$	50	-	
β -TG	$r = 0,21$	60	$r = 0,15$	73
F VIII R : Ag	$r = -0,08$	62	$r = -0,13$	75
TX B ₂	$r = 0,07$	50	$r = +0,00$	62
6-keto-PG F _{1α}	$r = -0,10$	52	$r = 0,11$	64

* $p < 0,05$

5.6.2 Korrelationen mit Thromboxan B_2 und 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$

Hier wurde den TX B_2 - und 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Werten ("Plasma-spiegel") die variablen Parameter Alter, Diabetes-Dauer, Hb A_{1c} , Blutglucose, Serum-Cholesterin, -Triglyceride, β -TG und F VIII R : Ag gegenübergestellt.

Bei den Korrelationsberechnungen mit TX B_2 konnten keine signifikanten Ergebnisse erhalten werden.

Als signifikante Ergebnisse stellten sich die Korrelationen von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ zu Blutglucose ($r = -0,26$; $p < 0,05$), β -TG (D: $r = 0,36$; $p < 0,01$ /D + K: $r = 0,40$; $p < 0,01$) und F VIII R : Ag (D: $r = 0,30$; $p < 0,05$ / D + K: $r = 0,35$; $p < 0,01$) dar.

Tabelle 4: Korrelation von Thromboxan B_2 mit Alter, Diabetes-Dauer, den akuten Blutwerten von Glucose, Hb A_{1c} und Lipiden sowie den Gerinnungsparametern β -TG, F VIII R : Ag und 6-keto-PG $F_{1\alpha}$

	Diabetiker	n	Diabetiker und Kontrollpersonen	n
Alter	$r = -0,10$	51	$r = -0,07$	63
Diabetes-Dauer	$r = -0,11$	51	-	
Hb A_{1c}	$r = -0,11$	48	-	
Blutglucose	$r = 0,12$	52	-	
Cholesterin	$r = -0,09$	48	-	
Triglyceride	$r = -0,14$	42	-	
β -TG	$r = 0,10$	49	$r = 0,18$	61
F VIII R : Ag	$r = -0,01$	51	$r = 0,12$	63
6-keto-PG $F_{1\alpha}$	$r = -0,03$	50	$r = 0,07$	62

Tabelle 5: Korrelation von 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ mit Alter, Diabetes-Dauer, den aktuellen Blutwerten von Glucose und Hb A_{1c} sowie den Gerinnungsparametern β -TG und F VIII R : Ag

	Diabetiker	n	Diabetiker und Kontrollpersonen	n
Alter	$r = 0,03$	52	$r = 0,04$	65
Diabetes-Dauer	$r = -0,13$	53	-	
Hb A_{1c}	$r = -0,06$	49	-	
Blutglucose	$r = -0,26^*$	53	-	
β -TG	$r = 0,36^{**}$	51	$r = 0,40^{**}$	63
F VIII R : Ag	$r = 0,30^*$	53	$r = 0,35^{**}$	65

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

5.7 Verlaufskontrolle der Gerinnungsparameter

Fünfzehn Patienten wurden im Abstand von ca. 1 Woche einer Nachuntersuchung unterzogen, wobei die aktuelle Blutglucose und die Gerinnungsparameter ADP-Schwellenkonzentration, β -TG, F VIII R : Ag, TX B_2 und 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ erneut bestimmt wurden. Die Mittelwerte dieser Parameter bei 1. und 2. Untersuchung wurden verglichen (siehe Tabelle 6).

Bei der ADP-Schwellenkonzentration gab es zwischen 1. und 2. Untersuchung einen signifikanten ($p < 0,05$), bei der Blutglucose einen hochsignifikanten ($p < 0,005$) Unterschied.

Tabelle 6: Vergleich der aktuellen Blutglucose und der Gerinnungsparameter bei 2 Untersuchungen im Abstand von ca. 1 Woche bei insulinpflichtigen Diabetikern ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)

	1.Untersuchung	2.Untersuchung	n	Signi- fikanz
Blutglucose (mg/dl)	282,5 $\pm$ 17,9	216,6 $\pm$ 20,9	15	p < 0,005
ADP - 50 % A (μ M)	1,95 $\pm$ 0,29	1,66 $\pm$ 0,23	15	p < 0,05
β -TG (ng/ml)	97,8 $\pm$ 23,7	67,3 $\pm$ 10,5	13	-
F VIII R : Ag (%)	162 $\pm$ 16	149 $\pm$ 11	13	-
TX B ₂ (pg/ml)	138,7 $\pm$ 26,5	95,8 $\pm$ 19,0	11	-
6-keto-PG F _{1α} (pg/ml)	42,7 $\pm$ 3,7	38,5 $\pm$ 1,9	15	-

Wurden zu diesem Vergleich nur diejenigen D herangezogen, deren Stoffwechsellagen sich unter der stationären Therapie eindeutig verbesserten, so wurden die signifikanten Unterschiede noch deutlicher: Zusätzlich bestanden signifikante Unterschiede bei F VIII R : Ag (p < 0,01) und TX B₂ (p < 0,05) zwischen 1. und 2. Untersuchung, während ein Unterschied bei der ADP-Schwellenkonzentration nicht mehr nachweisbar war. Die Signifikanz bei der Blutglucose wurde noch deutlicher (p < 0,0005); (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der aktuellen Blutglucose und der Gerinnungsparameter bei 2 Untersuchungen im Abstand von ca. 1 Woche bei insulinpflichtigen Diabetikern mit unter Therapie deutlich verbesserter Stoffwechsellaage ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)

	1.Untersuchung	2.Untersuchung	n	Signi- fikanz
Blutglucose (mg/dl)	277,3 $\pm$ 22,2	190,6 $\pm$ 18,8	11	p <0,0005
ADP - 50 % A (μ M)	1,84 $\pm$ 0,35	1,64 $\pm$ 0,28	11	-
β -TG (ng/ml)	119,8 $\pm$ 31,5	72,6 $\pm$ 14,4	9	-
F VIII R : Ag (%)	177 $\pm$ 21	149 $\pm$ 15	9	p <0,01
TX B ₂ (pg/ml)	136,7 $\pm$ 35,7	64,0 $\pm$ 12,9	7	p <0,05
6-keto-PG F _{1α} (pg/ml)	45,9 $\pm$ 4,7	39,7 $\pm$ 1,9	11	-

6. DISKUSSION

6.1 Thrombozytenaggregation (TA)

6.1.1 Problematik der Messung und Auswertung

Daten über das Ausmaß der TA sind in der Literatur schwer vergleichbar, da der Aggregationsvorgang nach unterschiedlichen Zeiten gemessen oder aber die Aggregationswelle verschieden quantifiziert wurde. Zum Teil wurde nur die Angabe "beschleunigte" oder "nicht beschleunigte" TA gemacht (132). Wiederum andere Autoren werteten nur das Auftreten einer zweiten TA-Welle (60), ohne Angaben über das Ausmaß zu machen. Darüberhinaus wurden recht unterschiedliche Konzentrationen der TA-Induktoren gewählt, z.B. 0,25 μM (180) bis 10 μM ADP (142). In den letzten Jahren hat das von Burrows vorgeschlagene Verfahren der Bildung einer "dose-response"-Kurve mit steigenden Konzentrationen des Aggregationsinduktors und Ermittlung des 50 %-Wertes der maximalen TA Zustimmung erfahren (18). Dieser Wert hat den Vorteil, daß er sich aus vier Werten zusammensetzt und somit größere Aussagekraft als die Einzelbestimmung besitzt. Zum anderen ist er gut graphisch darstellbar. Von einigen Autoren wurde der Begriff "Schwellenkonzentration" (threshold concentration) (140) angewendet, der auch in der vorliegenden Arbeit übernommen wurde.

6.1.2 TA-Tests bei Diabetikern

Es gilt heute als gesichert, daß Thrombozyten eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Angiopathien spielen. Eine große Zahl von Forschungsgruppen beschäftigte sich deshalb mit der Frage der Thrombozytenfunktion bei Diabetikern. So findet sich eine Vielzahl von Berichten über die TA bei Patienten mit Diabetes. Ein Grund dürfte hierfür in der relativ einfachen Durchführung des von Born (12) entwickelten nephelometrischen Verfahrens liegen. Außerdem gilt die TA als "The basic platelet reaction" (76). Breddin wies als erster auf die erhöhte Thrombozytenaggregabilität bei Diabetikern hin (14). Die TA wurde als erhöht (48/71/72), als normal (32/64/140) und als verändert (25/98/157) beschrieben.

Für diese divergenten Ergebnisse könnten folgende Gründe verantwortlich sein: Eine Ursache dürfte in dem bekannt hohen Variationskoeffizienten von Thrombozytenfunktions-tests (1) und in der geringen Anzahl von Probanden in den meisten der bisher publizierten Studien liegen. Außerdem wurden die Diabetiker meist ohne Berücksichtigung ihrer Stoffwechseleinstellung in Kollektive zusammengefaßt. Andere Autoren differenzierten nicht nach Patienten mit und ohne Gefäßkomplikationen (140).

Janka konnte unter Berücksichtigung der Stoffwechsellagen und unter Differenzierung nach Angiopathien bei einem als repräsentativ anzusehenden Patientenkollektiv eine gesteigerte TA bei Diabetikern, vor allem mit Mikroangiopathie, nachweisen (83).

Tabelle 8: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Diabetikern: + gesteigerte, - nicht gesteigerte Aggregation

Autor		Jahr	Patienten- anzahl	Ergebnis
Haanen	(64)	1968	47	-
Heath	(71)	1971	72	+
Bensoussaan	(6)	1975	18	+
O'Malley	(132)	1975	20	+
Colwell	(25)	1976	51	+
Davis	(32)	1978	56	-
Petersen	(140)	1978	38	-
Porta	(142)	1980	35	-
Janka	(83)	1983	509	+

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Janka (83) bestätigt werden: Im Vergleich mit Aggregationsergebnissen von gesunden, nichtdiabetischen Kontrollpersonen fällt eine hochsignifikant erhöhte Aggregationsneigung der Thrombozyten von D mit ausgeprägter Retinopathie auf. D mit minimaler R.d. wiesen eine signifikant geringere TA als D mit ausgeprägter R.d. auf.

Die Beziehung einer erhöhten TA zur Mikroangiopathie scheint eindeutig, da D mit R.d. I/II in einem hohen Prozentsatz, D mit R.d. III/IV einen dazu nochmals erhöhten Prozentsatz einen "spontanen" TA aufwiesen. Das Auftreten der "spontanen" TA ging signifikant mit einer erhöhten TA einher.

Der bereits erwähnte hohe Variationskoeffizient der TA-Tests dürfte auch in dieser Studie mit verantwortlich sein, daß nur eine signifikante Korrelation von ADP-

Schwellenkonzentration zu Cholesterin, beim Vergleich mit Stoffwechsel-, anderen Gerinnungsparametern, Diabetes-Dauer und Patientenalter gefunden werden konnte.

Der zugrundeliegende Mechanismus für die gesteigerte in vitro-Reaktivität der Thrombozyten bei Diabetikern ist nicht geklärt. Kreuzinkubationen von "normalen" Thrombozyten mit Patientenplasma ergaben keine Hinweise auf einen wichtigen Plasmafaktor, der für die veränderte Plättchenfunktion verantwortlich zu machen wäre (24/28). Die erhöhte Sensitivität gegenüber aggregierenden Substanzen dürfte deshalb ein Phänomen darstellen, das im Thrombozyten selbst begründet ist.

6.2 Faktor VIII assoziiertes Antigen

Von großer Bedeutung für die Thrombozyten-Funktion ist auch der von-Willebrand-Faktor, ein Glykoprotein, das essentiell ist für eine normale Thrombozyten-Adhäsion an subendothelialen Schichten. Das Material des von-Willebrand-Faktors, das mit heterologen Antiseren präzipitiert und das für die Thrombozyten-Adhäsivität verantwortlich ist, wird "Faktor VIII related antigen" (F VIII R : Ag) genannt (146). F VIII R : Ag wird hauptsächlich von Gefäßendothelzellen synthetisiert und auch dort gelagert (137). Der von-Willebrand-Faktor ist ein physiologischer Kofaktor der Thrombozyten-Adhäsion an die Gefäßwand, insbesondere in den sehr kleinen Gefäßen bei den dort herrschenden hohen Scherkräften (137/158). Erhöhte F VIII R : Ag-Spiegel gelten als Indikator eines Endothelschadens (81). Außerdem übt das F VIII/von-Willebrand-Protein offenbar auch einen Einfluß auf die TA aus (137). Aus diesem Grunde wurde seine vermittelnde Rolle bei der gesteigerten Reaktivität der Thrombozyten diskutiert (31).

Wiederholt wurden veränderte Plasma-Spiegel des von-Willebrand-Faktors/F VIII R : Ag bei Diabetikern und erhöhte Spiegel bei D mit Angiopathien beschrieben (6/29/83/108/135). Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden: Frisch entdeckte D und D mit Retinopathie wiesen hochsignifikant höhere Werte an F VIII R : Ag auf als Kontrollpersonen. D ohne R.d. erzielten signifikant höhere Werte als K.

6.3 β -Thromboglobulin

Das Thrombozyten-spezifische β -Globulin wurde von Moore, Pepper und Cash (128) isoliert, charakterisiert und β -Thromboglobulin genant. Dieses Protein, das in den Alpha-Granula der Thrombozyten vorkommt, ist Thrombozyten spezifisch; in anderen Geweben erscheint es nur in Spuren (128). β -TG soll die Prostazyklinbildung in der Gefäßwand hemmen (77) und die aktiven Bestandteile in den Alpha-Granula stabilisieren (127). β -TG gelangt in das Blut, wenn Thrombozyten stimuliert werden und die Freisetzungsreaktion durchlaufen. Am Erscheinen von β -TG im Plasma kann daher die in vivo-Thrombozytenreaktion erkannt werden.

Die Literatur gibt übereinstimmend an, daß die β -TG-Spiegel außer bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen (34) auch bei Diabetikern erhöht sind (18/20/87/144/161/184). Eine besonders deutliche Zunahme konnte bei gleichzeitig bestehender Mikroangiopathie beschrieben werden (83/144). Bei 7 frisch entdeckten Diabetikern wurde eine Normalisierung erhöhter β -TG-Werte nach adäquater Therapie beobachtet (144). Außerdem wurde eine Korrelation zwischen der β -TG-Konzentration und dem glykosylierten Hämoglobin Hb A₁ beschrieben (161), die von anderen Autoren allerdings nicht gefunden werden konnte (185). Die hohen β -TG-Spiegel könnten darauf hinweisen, daß bei

Diabetikern ein gesteigerter Thrombozytenverbrauch stattfindet (106).

Die bereits mehrfach getroffene Feststellung einer erhöhten β -TG Plasmakonzentration bei Diabetikern konnte bestätigt werden: Im Vergleich zu Kontrollpersonen wiesen D mit Retinopathie und frisch entdeckte D signifikant höhere Werte auf. Die erhöhten Werte der Gruppe der frisch entdeckten Diabetiker dürfte u.a. darin begründet sein, daß sich in dieser Gruppe auch diejenigen Patienten befanden, die im Stadium der Stoffwechselentgleisung und damit mit sehr hohen β -TG-Werten in diese Studie eingingen. Hierzu würden auch die nicht signifikant erhöhten Ergebnisse der D ohne R.d. passen, bei denen sich unter Therapie die β -TG-Werte nicht deutlich erhöhten. Erst beim Auftreten der Spätschäden des Diabetes mit z.B. manifester Retinopathie scheint es dann zum signifikanten β -TG-Anstieg zu kommen. Möglicherweise kommt bei diesem Patientenkollektiv mit höherem Durchschnittsalter zusätzlich eine Altersabhängigkeit des β -TG zum Ausdruck; manche Autoren geben für gefäßgesunde Patienten höheren Lebensalters einen erhöhten Normalwert an (186), ohne daß dafür eine Erklärung gefunden werden konnte (107).

Weiterhin finden sich bei den meisten Patienten und Patientengruppen extreme Schwankungsbereiche der β -TG-Werte (18), deren Ursache bislang unklar ist. Sicherlich ist die Blutentnahmetechnik eine der Hauptfehlerquellen. So ist es auch nicht verwunderlich, daß bislang keine eindeutige Korrelation von TA in vitro und Plasma- β -TG-Werten als Ausdruck der TA in vivo gefunden wurde. Aufgrund der Fehleranfälligkeit und des überaus hohen Variationskoeffizienten der β -TG-Bestimmung sollte eine Interpretation der Daten nur mit entsprechender Vorsicht erfolgen.

6.4 Plasmaspiegel der Prostaglandine

6.4.1 Problematik der Messung und Auswertung

Prostaglandine lassen sich mittels Bioassay, Gaschromatographie/Massenspektrometrie und Radioimmunoassay nachweisen. Zahlreiche RIAs wurden beschrieben, da dieses Verfahren am einfachsten zu handhaben, und für Messungen im Picogrammbereich am geeignetesten ist (44/61/115). Die hierbei publizierten Normbereiche für TX B₂ im Plasma streuen von 10 - 40 pg/ml bei Mc Cann et al. (116) und Morris et al. (129) bis zu 220 - 370 pg/ml bei Maurin et al. (115). Auffallend ist auch, daß zum Teil mit vorhergehender Plasma-Extraktion, zum Teil ohne Extraktion gearbeitet wurde.

Die 6-keto-PG F_{1α}-Werte für Normalpersonen variieren im Schrifttum ebenso. So wurden Werte z.B. kleiner als 5 pg/ml (149), 5 - 12 pg/ml (129/165) oder von 70 - 120 pg/ml (114) im Plasma beschrieben.

Diese erheblichen Unterschiede lassen sich durch Probanden-abhängige und durch Probanden-unabhängige Faktoren zum Teil erklären. So ist z.B. der TX B₂-Spiegel im Plasma bei älteren Personen signifikant höher als bei jüngeren (78), fettreiche Mahlzeiten können einen Einfluß auf die Bildung der Arachidonsäure ausüben (174), Nikotin-Konsum erniedrigt den Plasma-Spiegel von 6-keto-PG F_{1α} (104), nicht-steroidale Antiphlogistica erniedrigen den TX B₂-Spiegel (145) und nach körperlicher Belastung tritt eine hochsignifikante Erhöhung von 6-keto-PG F_{1α} im Plasma auf (149). Als prä-analytische, Probanden-unabhängige Faktoren gehen z.B. Technik der Blutentnahme, Kanülen-durchmesser, Temperatur bei der Blutentnahme, während der Zentrifugation und bei der Lagerung (170), sowie Lokalisation der Blutentnahmestelle im Kreislaufsystem in die Be-

stimmung ein. So gibt es Untersuchungen über höhere PG I_2 -Bildung in Arterien im Vergleich zu Venen bei Ratten (172) und umgekehrt höhere PG I_2 -Werte in Venen bei isolierten Gefäßen des menschlichen Gastrointestinaltrakts (123).

Von großer Bedeutung ist auch das bei der Blutgewinnung verwendete Antikoagulans und das zur Verhinderung der PG-Bildung in vitro zugegebene Pharmakon (114). So hemmt z.B. Acetylsalicylsäure die PG-Bildung durch Acetylierung einer Aminogruppe im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase (17/156), Indometacin hemmt die Fettsäurecyclooxygenase durch Konkurrenz mit dem Substrat Arachidonsäure (121). Es besteht auch in der Literatur keine Einigkeit über ein Extraktionsverfahren; außerdem wurden bei der Extraktion niedrige Wiederfindungsraten von z.B. 60 % beschrieben (23), während die Wiederfindung dieser Studie für TX B_2 bei 92 % und für 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ bei 83 % lag.

Ein weiterer Grund für die weite Variationsbreite der Messungen dürfte in den RIAs selbst begründet sein. Der Kit-Hersteller des in dieser Arbeit verwendeten RIAs gibt z.B. für 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ eine Kreuzreaktivität bezüglich PG $F_{1\alpha}$ von 2,6 %, PG E_1 von 1,9 %, TX B_2 von 1,4 %, PG E_2 von 1,1 % und für andere Strukturen unter 1 % an. Diese Angaben für die Spezifität des Antiserums erscheinen aber nach den eigenen Untersuchungen fraglich. Bei der Bestimmung von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ im sog. "Vollblutwert", d.h. venöses Blut ohne Antikoagulans im Wasserbad bei 37° C über 2 Stunden, ergaben sich für Normalpersonen Werte von 1025,1 $\pm$ 232,0 pg/ml ($\bar{x} \pm$ S.E.M.). In der Literatur herrscht jedoch Einigkeit, daß Prostazyklin Hauptmetabolit des Prostaglandinendoperoxid-Stoffwechsels im Endothel ist (122/126) und im Thrombozyten selbst nicht entsteht (80). Da die Ergebnisse des "Vollblutwerts" bei der TX B_2 -Bestimmung für Normalpersonen 2848,5 $\pm$ 212,9 pg/ml betragen,

scheidet als Grund für den hohen 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Wert eine, vom Hersteller des RIA-Kits mit nur 1,4 % angegebene, Kreuzreaktivität mit TX B_2 aus.

Aus den oben genannten mannigfaltigen methodischen Schwierigkeiten beim radioimmunologischen Nachweis und bei der komplizierten Extraktion von Prostaglandinen aus dem Plasma, scheint es nicht verwunderlich, daß die Normwerte in der Literatur für die jeweils gemessenen Strukturen in einem großen Streubereich liegen, und daß z.T. widersprüchliche Befunde erhoben worden sind. Dies könnte auch als Erklärung dienen, daß in dieser Arbeit keinerlei signifikante Korrelationen von TX B_2 zu Stoffwechsel- und anderen Gerinnungsparametern, Diabetes-Dauer und Patienten-Alter gefunden wurden.

So lange bei der Bestimmung von Prostaglandinen keine Standardisierung der Blutentnahme, der Blutverarbeitung, des Extraktionsvorganges und der Plasma-Lagerung erfolgt, scheint ein Vergleich von im Schrifttum angegebenen Werten fragwürdig (97). Es sollte daher beachtet werden, daß auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte nur in der Relation zu den gebildeten Gruppen eine gewisse (relative) Aussagekraft besitzen, und nicht als Absolutwerte verstanden werden sollten.

6.4.2 Prostaglandinbestimmungen bei Diabetikern

Es liegen mehrere Publikationen über Thromboxan-Bestimmungen bei Diabetikern vor. Dabei wurden meist erhöhte Thromboxanspiegel beschrieben (65/66/104/187), während Butkus et al. (19) bei Diabetikern ohne Angiopathie eine normale Produktionsrate nachwies. Es konnte gezeigt werden, daß Thrombozyten von D mehr Thromboxan aus AA synthetisieren, als Plättchen von Gesunden; außerdem enthalten Thrombozy-

ten von D mehr AA in ihren Phospholipiden (130). Obwohl beschrieben wurde, daß nach Stimulation die erhöhte TX B_2 -Produktion durch eine erhöhte Freisetzung von AA aus Phospholipiden hervorgerufen wird, wurde nachgewiesen, daß zugegebene AA bei D ebenfalls eine erhöhte TX B_2 -Freisetzung bewirkt. Dies könnte zeigen, daß die Abnormalität nicht einzig an einer erhöhten Aktivität der Phospholipase liegt (130).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten bei frisch entdeckten D und bei D ohne R.d. eine hochsignifikante Erhöhung der TX B_2 -Werte im Plasma gegenüber Kontrollpersonen. Bei D mit R.d. ergaben sich, verglichen mit K, signifikant erhöhte Werte.

Die Literatur gibt an, daß bei Diabetikern mit Retinopathie höhere Dosen an Prostazyklin erforderlich sind, um die Aggregatin zu hemmen (11/83). Außerdem wurde die Prostazyklin-Produktion in der Gefäßwand bei Diabetikern vermindert gefunden (89/104/162/168). Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von Fitzgerald et al. (42), die bei schwerer Atherosklerose eine erhöhte Ausscheidung von 2,3-dinor-6-keto-PG $F_{1\alpha}$, einem Urin-Metaboliten des PG I_2 , im Urin mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie ermittelten. Hierbei wurde zwischen biosynthetischer Kapazität von atherosklerotischen Gefäßen PG I_2 zu synthetisieren, die bei D als erniedrigt beschrieben wurde, und aktueller endogener PG I_2 -Produktionsrate, die im Vergleich zu Gesunden als erhöht gefunden wurde, unterschieden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten einen hochsignifikant erhöhten 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Spiegel bei frisch entdeckten Diabetikern gegenüber Kontrollpersonen. D ohne R.d. wiesen signifikant erhöhte 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Werte im Vergleich zu K auf.

Die bei D erhöht gefundenen 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ -Plasmaspiegel könnten als Hinweis auf die erhöhten Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen gelten. Es wäre denkbar, daß die Prostazyklin-Freisetzung Endothel-Läsionen widerspiegelt, da traumatische oder chemische Thrombozyten-Gefäßwand-Wechselwirkungen die PG I_2 -Produktion stimulieren (42). Die in dieser Arbeit ermittelten positiven signifikanten Korrelationen von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ mit β -TG und F VIII R : Ag unterstützen diese Überlegungen. Als Einschränkung gilt jedoch, daß wegen der komplizierten und fehleranfälligen Meßmethodik jegliche Interpretation sehr schwierig ist.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit bestand darin, daß TX B_2 nach Stimulation der Aggregation durch Zugabe von 0,5 μ g und 2,5 μ g Kollagen zu PRP, sowie nach 2-stündiger Gerinnung venösen Blutes ohne Antikoagulans im Wasserbad bei 37° C ("Vollblutwert") im Vergleich zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen auf signifikant nicht unterschiedlich hohe Werte anstieg. Außerdem differenzierte der Anstieg der TX B_2 -Werte nicht nach dem Ausmaß der Aktivierung. Sowohl bei Diabetikern, als auch bei den Kontrollpersonen sind die TX B_2 -Spiegel gleich hoch; und zwar beim "0,5 μ g-", "2,5 μ g-Kollagenwert" und bei dem als Maximum der TX B_2 -Produktion anzusehenden "Vollblutwert".

Es ergaben sich also für D gegenüber K erhöhte nicht stimulierte Plasmaspiegel für TX B_2 , und im Vergleich zu K gleich hohe stimulierte TX B_2 -Werte. Dies könnte dahin interpretiert werden, daß Thrombozyten bei D einer konstanten submaximalen Stimulation, als Ursache oder Folge der Angiopathie, ausgesetzt sind. Ein die Aggregation fördernder, bzw. die TX B_2 -Produktion verstärkender Stimulus könnte daher nicht zu einer hochmals gesteigerten TX B_2 -

Freisetzung führen. Diese Überlegungen stimmen mit einem erhöhten Thrombozyten-Verbrauch und einer erhöhten Thrombozyten-Aktivität bei D, korrelierend mit erhöhten β -TG-Werten, überein.

Die gleichen Befunde bei der Bestimmung des 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ beim "Vollblut-", "0,5-" und "2,5 μ g Kollagenwert" erscheinen jedoch aus den unter 4.6.1 genannten Gründen fraglich.

6.5 Stoffwechsellage und Thrombozytenfunktion

Der metabolische Aspekt der Thrombozytenfunktion berechtigt zu Überlegungen, ob der gestörte Stoffwechsel bei Diabetikern einen Einfluß auf das Verhalten der Thrombozyten ausübt. Da sich die TA als enzymabhängiger und energieverbrauchender Prozeß darstellt, könnte die gesteigerte TA bei Diabetikern durch besonders stoffwechselaktive Plättchen begründet sein. So wurde ein verzögertes Auftreten der 2. TA-Welle bei sieben Diabetikern nach Stoffwechseleinstellung (141), eine Steigerung der TA bei fünf Diabetikern während der Hypoglykämie (75), verminderte TA bei Diabetikern mit Blutglucosekonzentrationen über 160 mg/dl (179) und eine Normalisierung erhöhter β -TG-Werte bei sieben frisch entdeckten Diabetikern nach adäquater Therapie (144) beschrieben.

Andere Publikationen weisen indirekt auf eine gestörte Thrombozytenfunktion während einer Stoffwechselentgleisung hin (117/136). Es konnte gezeigt werden, daß in der diabetischen Ketoazidose die Thrombozytenfunktion im Vergleich zu späteren Kontrollen eingeschränkt, d.h. die TA vermindert ist. Ein gleichzeitig reduzierter PG I_2 -vermittelter cAMP-Anstieg im PRP (als Hinweis auf die Adeny-

latzyklase-Aktivität) könnte ebenso als Ausdruck eines gestörten Thrombozytenstoffwechsels gewertet werden (33). Nach Besserung der Diabetes-Einstellung zeigte sich eine gesteigerte Aggregabilität der Thrombozyten, sowie ein deutlich gesteigerter cAMP-Anstieg bei PG I₂-Stimulation (33).

Die Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von der Diabetes-Einstellung könnte in der ungünstigen metabolischen Situation bei einer Stoffwechselentgleisung, die die Thrombozytenaktivität als energieabhängigen Prozeß beeinträchtigt, begründet sein. Die bei verbesserter Diabetes-einstellung beobachtete gesteigerte Aggregabilität ist möglicherweise durch eine erhöhte Anzahl junger Thrombozyten bedingt (28/51), von denen bekannt ist, daß sie erhöhte Enzymaktivitäten aufweisen (92/93). Das Verhalten der verminderten Aggregabilität der Thrombozyten bei Hyperglykämie scheint erstaunlich, da eine schlechte Stoffwechseleinstellung als Schrittmacher für Gefäßkomplikationen gilt. Gesteigert aktivierte Thrombozyten würden aber im Widerspruch zu Erythrozyten und Leukozyten stehen, die bei einer Stoffwechselentgleisung subnormale Funktionen aufweisen (91/141). Die in der Ketoazidose beobachtete Hemmung der Thrombozytenfunktion (85) dürfte einen Schutzfaktor für den Organismus darstellen, während eine stets erhöhte Aggregabilität der Thrombozyten bei Diabetikern gegenüber Kontrollpersonen das Auftreten der Angiopathie begünstigen könnte.

Im hyperglykämischen Stadium wurde eine herabgesetzte Prostazyklin-Produktion des Endothels beschrieben (89/169), die für den Effekt einer verminderten Thrombozyten-Aggregabilität verantwortlich sein könnte.

Es ist bekannt, daß ein diätetischer Mangel essentieller Fettsäuren auch zu einer verminderten Prostaglandinbildung führt. So kommt es beim Fehlen von Linolsäure zu ei-

ner starken Abnahme der PG-Vorstufen und der Arachidonsäure, sowie zum Anstieg eines Inhibitors der Fettsäurecyclooxygenase (35). Aus einer ω -3-Fettsäure-reichen Ernährung (z.B. Meeresfische) folgt eine Hemmung der Thromboxansynthese in Thrombozyten (167) und klinisch eine verlängerte Blutungszeit, die z.B. bei Eskimos besteht und mit dem veränderten PG-Stoffwechsel in Zusammenhang gebracht wird (37). Es wäre denkbar, daß umgekehrt ein erhöhtes Fettsäure-Angebot, wie es beim Diabetiker bestehen kann, Wirkungen auf die PG-Synthese ausübt, zumal beschrieben wurde, daß fettreiche Mahlzeiten Einfluß auf die Bildung der Arachidonsäure nehmen (174). Obwohl für die bei Diabetikern oftmals erhöhten Blutfette keinerlei fördernde Effekte auf die TA nachgewiesen werden konnte (83), könnten sie doch über die PG-Bildung Einfluß auf die Aggregabilität der Thrombozyten nehmen.

Von der Thrombozyten-Membran aufgenommenes Cholesterin fördert die TX B₂-Produktion durch Blutplättchen (174). Wenn Thrombozyten stimuliert werden, dürften abnorm hohe Plasma-Cholesterin-Spiegel eine erhöhte Freisetzung von AA aus Thrombozyten-Phospholipiden bewirken, und auch die Umwandlung von freigesetzter AA zu TX B₂ steigern (130). Falls das vermehrte Cholesterin der Plättchen-Membran verantwortlich ist für eine erhöhte TX B₂-Bildung, könnte die gesteigerte Thrombozyten-Aktivität bei D Folge der abnormen Lipid-Konzentrationen im Plasma sein (130).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich unter Therapie bei Verbesserung der Stoffwechsellage die gemessenen Gerinnungsparameter z.T. signifikant ändern. Neben einer hochsignifikant verminderten Blutglukosekonzentration zeigten die stationär therapierten Diabetiker im Vergleich der 2 Messungen im Abstand von ca. 1 Woche eine signifikante Verminderung der TX B₂-, und eine

hochsignifikante Verminderung der F VIII R : Ag-Werte. Die Werte für ADP - 50 % TA, β -TG und 6-keto-PG F_{1 α} zeigten in der Tendenz deutliche Abnahmen, die eventuell bei größeren Patientenzahlen signifikant gewesen wären.

Es ist natürlich zu bedenken, wie weit es sinnvoll ist, von der relativ kurzen Beobachtungszeit auf einen Langzeiteffekt zu schließen.

Der Befund einer signifikant verminderten ADP - 50 % TA bei allen im Abstand von ca. 1 Woche verglichenen Diabetikern deckt sich mit den Ergebnissen von Janka (83), der eine signifikante Korrelation von ADP-Schwellenkonzentration mit den Blutglucosespiegeln, d.h. je niedriger die Blutglucose umso mehr aggregierten die Thrombozyten, fand.

Der Einfluß der Stoffwechsellage auf die Thrombozytenfunktion bei Diabetikern konnte für die TA und β -TG auch in der vorliegenden Doktorarbeit bestätigt werden, für die Thromboxan-Spiegel wurde er erstmals nachgewiesen. Es wird Aufgabe künftiger Studien sein, die Stoffwechselsubstrate, etwa freie Fettsäuren, zu identifizieren, die für die Veränderungen verantwortlich sind.

6.6 Abschließende Betrachtungen der Ergebnisse

Bei der Pathogenese der Mikro- und Makroangiopathie des Diabetikers wird den Thrombozyten eine zentrale Rolle zuerkannt. So finden sich im Schrifttum zahlreiche Hinweise auf die Schlüsselrolle der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen für die Entstehung von Atherosklerose und diabetischer Mikroangiopathie (28/50). Bei allen Theorien steht am Beginn dieses Prozesses stets eine Verletzung oder eine Dysfunktion des Gefäßendothels, für die sich beim Diabetiker gehäuft Faktoren wie z.B. Hypertonie, Hyperchole-

sterinämie, Hyperglykämie, Immunkomplexe und Bakterien finden (28/50/84/88).

Berichte über gesteigerte TA bei Diabetikern mit Mikroangiopathie (83), erhöhte Spiegel an F VIII R : Ag (83/108/135), β -TG (18/144/161) und TX B₂ (66/104/187) im Plasma bei Diabetikern konnten bestätigt werden, während Publikationen über verminderte Prostazyklin-Synthesen im Endothel von Diabetikern (89/104/168) nicht nachvollzogen werden konnten. Nach den eigenen Beobachtungen lagen die 6-keto-PG F_{1 α} -Werte bei Diabetikern gegenüber Kontrollpersonen signifikant höher.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für D mit fortgeschrittener Mikroangiopathie eine signifikant erhöhte TA gegenüber K, für D signifikant erhöhte Werte an F VIII R : Ag, β -TG, TX B₂ und 6-keto-PG F_{1 α} im Vergleich zu K.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich unter Therapie mit Verbesserung der Stoffwechsellage bei Diabetikern außer den Blutglucosewerten auch die F VIII R : Ag- und TX B₂-Plasmaspiegel signifikant vermindern. Für ADP - 50 % TA, β -TG und 6-keto-PG F_{1 α} konnte dies nur in der Tendenz nachgewiesen werden.

Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß Prostaglandin-Messungen wegen zahlreicher methodischer Schwierigkeiten des immunologischen Nachweises und der aufwendigen und komplizierten Extraktion aus dem Plasma, eine große Fehleranfälligkeit und einen hohen Variationskoeffizienten aufweisen. Da zusätzlich eine Vielzahl Probanden-abhängiger und Probanden-unabhängiger, die Ergebnisse des RIAs verfälschende Faktoren, nie völlig ausgeschlossen werden können, und bis heute keine Standardisierung der PG-Bestimmungen erfolgt ist, sollte eine Interpretation der gewonnen Daten und ein Vergleich der in der Literatur angegebenen Werte nur mit entsprechender Vorsicht erfolgen.

Diese Studie konnte durch Messungen von Faktoren, die einen Einfluß auf die Thrombozytenfunktion ausüben, eine erhöhte Aggregabilität der Thrombozyten bei Diabetikern nachvollziehen. Eine erhöhte Thromboxan-Synthese konnte ebenfalls aufgezeigt werden.

Hiermit wurden Hinweise auf einen erhöhten Thrombozyten-Verbrauch gefunden, der mit der Angiopathie eng verbunden ist. Eine pharmakologische Beeinflussung könnte für den Patienten von Vorteil sein.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Pathogenese der Mikro- und Makroangiopathie des Diabetikers wird den Thrombozyten eine bedeutende Rolle zuerkannt. Das Verständnis der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen wurde durch die Entdeckung der Prostaglandine erheblich gefördert. $TX A_2$ und $PG I_2$ üben großen Einfluß auf die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Endothel aus: Das von Thrombozyten gebildete $TX A_2$ wirkt, indem es die Plättchen-Aggregation fördert und die Gefäße kontrahiert, antagonistisch zu dem vom Endothel synthetisierten $PG I_2$.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, stabile Metaboliten dieser entgegengesetzt wirkenden Prostaglandine quantitativ bei Diabetikern mit und ohne Gefäßkomplikationen im Plasma zu bestimmen.

Die Validität, Zuverlässigkeit und Beeinflußbarkeit der verwendeten RIAs, sowie die Wiederfindungsrate des Plasma-Extraktionsverfahrens wurden überprüft.

Außerdem wurden Thrombozytenaggregation, F VIII R : Ag- und β -TG-Plasmaspiegel gemessen und versucht, diese Ergebnisse mit den PG-Bestimmungen und den aktuellen Stoffwechselparametern in Bezug zu setzen.

Weiterhin wurden Hinweise auf die Stoffwechselabhängigkeit, bzw. Einfluß der Diabeteseinstellung auf die Plasmaspiegel der Prostaglandine im Vergleich zu anderen Gerinnungsparametern gewonnen.

Bei 81 Patienten und 13 Kontrollpersonen wurden Untersuchungen zur induzierten und spontanen TA durchgeführt. Diabetiker mit fortgeschrittener Mikroangiopathie zeigten die höchsten Aggregationswerte: Die ADP-Schwellenkonzen-

tration betrug bei Diabetikern mit ausgeprägter Retinopathie $1,29 \pm 0,41 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$ gegen K), bei D mit minimaler R.d. $2,23 \pm 0,27 \mu\text{M}$, bei den D ohne R.d. $2,01 \pm 0,18 \mu\text{M}$, bei frisch entdeckten D $2,03 \pm 0,35 \mu\text{M}$ und bei den Kontrollpersonen $2,52 \pm 0,22 \mu\text{M}$.

Als einzige signifikante Korrelation von Stoffwechsel-, anderen Gerinnungsparametern, Diabetes-Dauer und Patientenalter mit der TA in vitro wurde eine signifikante Beziehung zum Serum-Cholesterin ($p < 0,05$) gefunden.

Mögliche Hinweise auf eine Endothelschädigung bei Diabetikern ließen sich an den Werten des Faktor VIII assoziierten Antigens ablesen: Diabetiker wiesen im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant höhere Werte auf: D mit R.d. $172 \pm 13 \%$ ($p < 0,005$ gegen K), D ohne R.d. $148 \pm 10 \%$ ($p < 0,05$ gegen K), frisch entdeckte D $178 \pm 22 \%$ ($p < 0,01$ gegen K); Kontrollpersonen $110 \pm 9 \%$.

Eine gesteigerte Thrombozytenreaktion und ein erhöhter Thrombozytenabbau in vivo lassen sich aus den Plasma- β -Thromboglobulin- und TX B_2 -Spiegeln ableiten. Für β -TG wurden bei D erhöhte Werte gefunden: D mit R.d. $121,9 \pm 16,7 \text{ ng/ml}$ ($p < 0,01$ gegen K), D ohne R.d. $97,7 \pm 15,9 \text{ ng/ml}$, frisch entdeckte D $144,0 \pm 28,9 \text{ ng/ml}$ ($p < 0,01$ gegen K); Kontrollpersonen $58,2 \pm 13,6 \text{ ng/ml}$.

Die ermittelten Werte für TX B_2 zeigten für Diabetiker ebenfalls erhöhte Plasmaspiegel: D mit R.d. $115,4 \pm 31,6 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,05$ gegen K), D ohne R.d. $121,5 \pm 19,6 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,001$ gegen K), frisch entdeckte D $76,2 \pm 15,3 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,005$ gegen K); Kontrollpersonen $27,8 \pm 6,0 \text{ pg/ml}$.

Als möglicher Ausdruck einer gesteigerten Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion bei Diabetikern wurden für 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ erhöhte Werte gefunden: D mit R.d. $44,5 \pm 3,3$

pg/ml, D ohne R.d. $48,0 \pm 3,0$ pg/ml ($p < 0,05$ gegen K), frisch entdeckte D $56,9 \pm 5,6$ pg/ml ($p < 0,005$ gegen K); Kontrollpersonen $34,3 \pm 4,4$ pg/ml.

Signifikante Korrelationen von TX B_2 mit anderen Gerinnungs- und Stoffwechselfparametern, sowie Diabetes-Dauer oder Patientenalter konnten nicht erhalten werden.

Als signifikante Ergebnisse stellten sich die Korrelationen von 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ zu Blutglucose ($p < 0,05$) β -TG ($p < 0,01$) und F VIII R : Ag ($p < 0,05$) bei Diabetikern dar. Der positive Zusammenhang zwischen 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ mit β -TG und F VIII R : Ag unterstreicht die Überlegung, daß die vermehrte Prostazyklin-Freisetzung bei Diabetikern in Beziehung zur gesteigerten Thrombozyten-Endothel-Interaktion steht.

Bei der Stimulation der TX B_2 -Bildung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen beobachtet; die TX B_2 -Spiegel stiegen, vom Ausmaß der Stärke der Stimulation unabhängig, bei beiden Gruppen gleich an.

Die für die PG-Messung verwendeten RIAs zeigten eine große Beeinflußbarkeit durch Probanden-abhängige und prä-analytische, Probanden-unabhängige Faktoren.

Auch die Spezifität der Antiseren scheint fraglich: Für das im Endothel gebildete 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ wurden nach einer Gerinnungszeit der Blutprobe ohne zugegebenes Antikoagulans im Wasserbad bei 37°C über 2 Stunden derart hohe Werte ermittelt, die sich mit der vom Kit-Hersteller angegebenen Kreuzreaktivität nicht erklären lassen.

Die Wiederfindungsrate der Plasmaextraktion bei TX B_2 mit 92 % und bei 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ mit 83 % kann als gut bezeichnet werden.

Im Zuge einer Nachuntersuchung bei 15 Patienten im Abstand von ca. 1 Woche wurden Hinweise auf den Einfluß einer verbesserten Stoffwechsellage nach stationärer Therapie gewonnen. Bei der 2. Untersuchung waren neben einer hochsignifikanten Verminderung ($p < 0,0005$) der Blutglucose-Konzentrationen, die F VIII R : Ag- ($p < 0,01$) und TX B₂-Plasma-Spiegel ($p < 0,05$) signifikant vermindert. Die Werte für ADP-Schwellenkonzentration, β -TG und 6-keto-PG F_{1 α} waren in der Tendenz z.T. deutlich geringer.

Zusammengefaßt wurde gezeigt, daß durch Messungen von Faktoren, die einen Einfluß auf die Thrombozytenfunktion ausüben, eine erhöhte Aggregabilität der Thrombozyten bei Diabetikern nachvollzogen werden konnte. Bei den hierbei neu in die Diskussion einbezogenen Prostaglandinen TX A₂ und PG I₂ konnten für ihre Abbauprodukte erhöhte Plasmaspiegel bei Diabetikern gefunden werden.

Eine pharmakologische Beeinflussung dieser eng mit der Angiopathie des Diabetikers in Zusammenhang stehenden Parameter könnte von Vorteil für den Patienten sein.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Avenarius, H.J., Deinhardt, J.:
Durchführung und Auswertung von Aggregationstests
In: v. Voss, H., Göbel, U.: Praktische Anwendung
der Thrombozytenfunktionsdiagnose
Georg Thieme, Stuttgart (1980) 57
2. Ballantyne, A.J., Löwenstein, A.:
Diseases of the retina
Trans. ophthal. Soc. U.K. 63 (1943) 95
3. Baroody, R.A., Bito, L.Z.:
The impermeability of the basic cell membrane to
thromboxane B₂, prostacyclin and 6-keto-PG F_{1α}
Prostaglandins 21 (1981) 133
4. Baumgartner, H.R.:
Arteriosklerose und Thrombose,
neue pathogenetische Gesichtspunkte
Internist 19 (1978) 627
5. Bennett, J.S., Vilaire, G., Burch, J.W.:
A role for prostaglandins and thromboxanes in the
exposure of platelet fibrinogen receptors
J. clin. Invest. 68 (1981) 981
6. Bensoussan, D., Levy-Toledano, S., Passa, P.,
Caen, J., Canivet, J.:
Platelet hyperaggregation and increased plasma
level of Von Willebrand Factor in diabetics with
retinopathy
Diabetologica 11 (1975) 307
7. Bergström, S., Carlsson, L.A., Weeks, J.R.:
The prostaglandins: A family of biologically
active lipids
Pharmacol. Rev. 20 (1968) 1
8. Bergström, S., Ryhage, B., Samuelsson, B.,
Sjövall, J.:
The structure of prostaglandin E₁, F₁ and F₂
Acta chem. scand. 16 (1962) 501
9. Bergström, S., Sjövall, J.:
The isolation of prostaglandin
Acta chem. scand. 11 (1957) 1086

10. Best, L.C., Martin, T.J., Russell, R.G.G., Preston, F.E.:
Prostacyclin increases cyclic AMP levels and adenylate cyclase activity in platelets
Nature (Lond.) 267 (1977) 850
11. Betteridge, D.J., El Tahir, K.E.H., Reckless, J.P.D., Williams, K.I.:
Platelets from diabetic subjects show diminished sensitivity to prostacyclin
Europ. J. Clin. Invest. 12 (1982) 395
12. Born, G.V.R.:
Aggregation of blood platelets by adenosin diphosphate and its reversal
Nature 194 (1962) 927
13. Breddin, K.:
Über die gesteigerte Thrombozytenaggregation bei Gefäßkrankheiten
Schweiz. Med. Wschr. 95 (1965) 655
14. Breddin, K.:
Untersuchungen über die Agglutinationsbereitschaft der Thrombozyten bei Gefäßkrankheiten
In: Emmrich, R., Perlick, E.: Gefäßwand und Blutplasma, VEB Gustav Fischer, Jena, Berlin (1963) 347
15. Breddin, K., Grun, H., Krzywanek, H.J., Schremmer, W.P.:
Zur Messung der "spontanen" Thrombozytenaggregation
Plättchenaggregationstest III Methodik
6. Klin. Wschr., 53. Jahrgang (1975) 81
16. Breddin, K., Krzywanek, H.J., Bald, U., Kutschera, J.:
Is enhanced platelet aggregation a risk factor for thrombo-embolic complications in atherosclerosis?
In: Schettler, G., Weizel, A.: Atherosclerosis III. Springer, Heidelberg, New York (1974) 197
17. Burch, J.W., Stanford, N., Majerus, P.W.:
Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin
J. Clin. Invest. 61 (1978) 314
18. Burrows, A.W., Chavin, S.I., Hockaday, T.D.R.:
Plasma-thromboglobulin concentrations in diabetes mellitus
Lancet 1 (1978) 235

19. Butkus, A., Skrinska, V.A., Schumacher, O.P.:
Thromboxane production and platelet aggregation
in diabetic subjects with clinical complications
Thromb. Res. 19 (1980) 211
20. Campbell, I.W., Dawes, J., Fraser, D.M., Pepper,
D.S., Clarke, B.F., Duncan, L.J.P., Cash, J.D.:
Plasma β -thromboglobulin in diabetes mellitus
Diabetes 26 (1977) 1175
21. Cho, M.J., Allen, M.A.:
Chemical stability of prostacyclin (PG I₂) in
aqueous solutions
Prostaglandins 15(1978) 943
22. Claesson, H.E., Malmsten, C.:
On the interrelationship of prostaglandin endopero-
xide G₂ and cyclic nucleotides in platelet function
Eur. J. Biochem. 76 (1977) 277
23. Coker, S.J., Parratt, J.R., Ledingham, I.M.,
Zeitlin, I.J.:
Thromboxane and prostacyclin release from ischaemic
myocardium in relation of arrhythmias
Nature 291 (1981) 323
24. Collier, B.S., Frank, R., Milton, R.C.
Gralnick, H.R.:
Plasma cofactors of platelet function: correlation
with diabetic retinopathy and hemoglobins A_{1a-c}
Ann. Int. Med. 88 (1978) 311
25. Colwell, J.A., Halushka, P.V., Sarji, K., Levine,
J., Sagel, J., Nair, R.M.G.:
Altered platelet function in diabetes mellitus
Diabetes 25 (Suppl. 2) (1976) 826
26. Colwell, J.A., Halushka, P.V., Sarji, K.E., Lopes-
Virella, M.F., Sagel, J.:
Vascular disease in diabetes
Arch. Intern. Med. 139 (1979) 225
27. Colwell, J.A., Halushka, P.V., Sarji, K.E.,
Sagel, J.:
Platelet function and diabetes mellitus
Med. Clin. North. Am. 62 (1978) 753
28. Colwell, J.A., Lopes-Virella, M.F., Halushka, P.V.:
Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus
Diabetes Care 4 (1981) 121

29. Colwell, J.A., Nair, R.M.G., Halushka, R.V. et al.:
Platelet adhesion and aggregation in
diabetes mellitus
Metabolism 28 (Suppl. 1) (1979) 394
30. Corey, E.J., Keck, G.E., Székely, I.:
Synthesis of Vanes prostaglandin X, 6,9 α -15 - α -
dihydroxyprosta-(Z) 5, (E) 13-dienoic acid
J. Amer. Chem. Soc. 99 (1977) 2006
31. Cowan, D.H.:
Acquired disorders of platelet function
In: Colman, R.W., Hirsch, J., Marder, V.J., Salz-
mann, E.W. (eds.): Hemostasis and thrombosis
J.B. Lippincott, Philadelphia - Toronto (1982) 516
32. Davis, J.W., Phillips, P.E., Yue, K.T.:
Platelet aggregation. Adult-onset diabetes mellitus
and coronary artery disease
JAMA 239 (1978) 732
33. Demmel, P.:
Der Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die
Thrombozytenfunktion des Diabetikers
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität,
München (1983)
34. Denham, M.J., Fisher, M., James, G., Hassan, M.:
Plasma concentration of β -thromboglobulin in venous
and arterial thrombosis
Lancet 1 (1977) 1154
35. Dorp van, D.:
Recent developments in the biosynthesis and the
analysis of prostaglandins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 180 (1971) 181
36. Dorp. D.A. van, Beerthuis, R.K., Nugteren, D.H.,
Vonkeman, H.:
The biosynthesis of prostaglandins
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 90 (1964) 204
37. Dyerberg, J., Bang, H.O.:
All cis-5,8, 11, 14, 17-eicosapentaeonic
acid and triene prostaglandins: Potential
antithrombotic agents
Scand. J. clin. Lab. Invest. 40 (1980) 589

38. Euler, U.S. von:
Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz
des menschlichen Prostata- und Samenblasensekrets
Klin. Wschr. 14 (1935) 1182
39. Euler, U.S. von:
Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen
von Nativsekreten und Extrakten männlicher
accessorischer Geschlechtsdrüsen
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 175 (1934) 78
40. Feinstein, M.E., Becker, E., Fraser, C.:
Thrombin, collagen and A 23187 stimulate endogenous
arachidonate metabolism: differential inhibition
by PG E, local anaesthetics and a serine-protease
inhibitor
Prostaglandins 14 (1977) 1075
41. Fitzgerald, G.A., Pedersen, A.K., Patrono, C.:
Analysis of prostacyclin and thromboxane
biosynthesis in cardio-vascular disease
Circulation 67 (1983) 1174
42. Fitzgerald, G.A., Smith, B., Pedersen, A.K.,
Brash, A.R.:
Increased prostacyclin biosynthesis in patients
with severe atherosclerosis and platelet activation
N. Engl. J. Med. 310 (1984) 1065
43. Fitzpatrick, F.A., Gorman, R.R.:
Regulatory role of cyclic 3', 5'-monophosphate on
the platelet cyclooxygenase and platelet function
Biochem. Biophys. Act. 582 (1979) 44
44. Fitzpatrick, F.A., Gorman, R.R., McGuire, J.C.,
Kelly, R.C., Wynalda, M.A., Sun, F.F.:
A radioimmunoassay for thromboxane B₂
Anal. Biochem. 82 (1977) 18
45. Friedman, R.J., Burns, E.R.:
Role of platelets in the proliferate response of
the injured artery
Prog. Hemost. Thromb. 4 (1978) 249
46. Fujimoto, T., Ohara, S., Hawiger, J.:
Thrombin-induced exposure and prostacyclin
inhibition of the receptor for factor VIII/
von Willebrand factor on human platelets
J. clin. Invest. 69 (1982) 1212

47. Fuller, J.H.:
Hemostatic Function Tests Associated with
Diabetic Microangiopathy
Horm. Met. Res. (Supp. 11) (1981) 59
48. Fuller, J.H., Shipley, M.J., Rose, G., Jarett,
R.J., Keen, H.:
Coronary-heart-disease risk and impaired
glucose tolerance
The Whitehall Study. Lancet 1 (1980) 1373
49. Fuster, V., Bowie, E.J.C., Lewis, J.C., Fass, D.N.,
Owen, C.A. jr., Brown, A.L.:
Resistance to arteriosclerosis in pigs with
von Willebrand's disease
J. Clin. Invest. 61 (1978) 722
50. Ganda, O.M.:
Pathogenesis of macrovascular disease in the
human diabetic
Diabetes 29 (1980) 931
51. Garg, S.K., Lackner, H., Karparkin, S.:
The increased percentage of megathrombocytes
in various clinical disorders
Ann. Intern. Med. 77 (1972) 361
52. Gensini, G.F., Abbate, R., Favilla, S., Neri
Seneri, G.G.:
Changes of platelet function and blood clotting
in diabetes mellitus
Thrombos. Haemostas. 42 (1979) 983
53. George, J.N., Käser-Glanzmann, R., Kallbora, M.,
Lüscher, E.F.:
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate stimulation
of active calcium transport by a membrane fraction
from human platelets: A possible controlling
mechanism of platelet function
Blood 48 (1976) 1007
54. Gerlach, E., Deuticke, B., Dreisbach, R.H.:
Der Nucleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauer-
stoffmangel und seine mögliche Bedeutung für
die Coronardurchblutung
Naturwissenschaften 50 (1963) 228
55. Gerrard, J.M., White, J.G.:
Prostaglandins and thromboxanes: "Middlemen" modula-
ting platelet function in hemostasis and thrombosis
Progr. Hemostas. Thromb. 4 (1978) 87

56. Goldblatt, M.W.:
A depressor substance in seminal fluid
J. soc. Chem. Ind. (London) 52 (1933) 1956
57. Gorman, R.R.:
Modulation of human platelet function by
prostacyclin and thromboxane A₂
Fed. Proc. 38 (1979) 83
58. Gorman, R.R., Bundy, G.L., Peterson, D.C., Sun,
F.F., Miller, O.V., Fitzpatrick, F.A.:
Inhibition of human platelet thromboxane
synthetase by 9,11-azoprostano-5,13-dienoic acid
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 74 (1977) 4007
59. Gorman, R.R., Bunting, S., Miller, O.V.:
Modulation of human platelet adenylate cyclase
by prostacyclin (PG X)
Prostaglandins 13 (1977) 377
60. Gormsen, J., Nielsen, J.D., Andersen, L.A.:
ADP-induced platelet aggregation in vitro in
patients with ischemic heart disease and
peripheral thromboatherosclerosis
Acta Med. Scand. 201 (1977) 509
61. Granström, E., Kindahl, H.:
Radioimmunoassay of prostaglandins and thromboxanes
Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 5 (1978) 119
62. Griggs, T.R., Reddick, R.L., Sultz, D.,
Brinkhous, K.M.:
Susceptibility to atherosclerosis in
aortas and coronary arteries of swine with
von Willebrand's disease
Am. J. Pathol. 102 (1981) 137
63. Gross, R., Schneider, W.:
Energy metabolism
In: Johnson, S.A. (Hrsg.): The circulation platelet
Academic Press, New York 1971
64. Haanen, C., Holdriut, A.:
Blood platelet aggregation under various
conditions and in some disease
Exp. Biol. Med. 3 (1968) 164

65. Halushka, P.V., Rogers, C., Loadholt, C.B., Colwell, J.A.:
Increased platelet thromboxane synthesis in diabetes mellitus
J. Lab. Clin. 97 (1981) 87
66. Halushka, P.V., Rogers, R.C., Loadholt, C.B., Wohltman, H., Mayfield, R., McCoy, S., Colwell, J.A.:
Increased platelet prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetes mellitus
Horm. Metabol. Res. Suppl. 11 (1981) 7
67. Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B.:
Prostaglandin endoperoxides
A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 71 (1974) 3824
68. Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B.:
Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 72 (1975) 2994
69. Harlan, J.M., Harker, L.A.:
Hemostasis, thrombosis, and thromboembolic disorders. The role of arachidonic acid metabolites in platelet-vessel wall interactions
Med. Clin. N. Amer. 65 (1981) 855
70. Hathaway, D.R., Eaton, C.R., Adelstein, R.S.:
Regulation of human platelet myosin kinase by calcium-calmodulin and cyclic AMP
In: Mann, K.G. (Hrsg.): The regulation of Coagulation. New York, Elsevier (1980) 271
71. Heath, H., Bridgen, W.D., Canever, J.V., Pollock, J., Hunter, P.R., Kelsey, J., Bloom, A.:
Platelet adhesiveness and aggregation in relation to diabetic retinopathy
Diabetologia 7 (1971) 308
72. Hellem, A.J.:
Adenosine diphosphate induced platelet adhesiveness in diabetes mellitus with complications
Acta Med. Scand. 190 (1971) 291
73. Higgs, G.A., Moncada, S., Vane, J.R.:
Prostacyclin (PG I₂) inhibits the formation of platelet thrombi induced by adenosine diphosphate (ADP) in vivo
Brit. J. Pharmacol. 61 (1977) 137P

74. Higgs, E.A., Moncada, S., Vane, J.R., Caen, J.P., Miche, H., Tobelem, G.:
Effect of prostacyclin (PG I₂) on platelet adhesion to rabbit arterial Subendothelium
Prostaglandins 16 (1978) 17
75. Hilstedt, J., Madstad, S., Nielsen, J.D., Krarup, T., Sestoft, L., Gormsen, J.:
Hypoglycemia and hemostatic parameters in juvenile onset diabetes
Diab. Care 3 (1980) 675
76. Holmsen, H.:
Prostaglandin endoperoxidethromboxane snythesis and dense granule secretion as positive feedback loops in the propagation of platelet response during "The Basic Platelet Reaction"
Thrombo. Haemostas. (Stuttg.) 38 (1977) 1030
77. Hope, W., Martin, T.J., Chesterman, C.N., Morgan, F.J.:
Human β -thromboglobulin inhibits PG I₂ production and binds to a specific site in bovine aortic endothelial cells
Nature 282 (1979) 210
78. Hornyh, A., Krief, C., Bariety, J.:
Radioimmunoassay measurement of thromboxane B₂ in human plasma and urine
Prostaglandins Leukotrienes Med. 8 (1982) 467
79. Instruction Manual:
BIO-RAD Hemoglobin A_{1c} by Column Test
Bulletin 4237 (1983)
80. Ishibashi, T., Tanaka, K., Taniguchi, Y.:
Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats
Diabetes 30 (1981) 601
81. Jaffe, E.A.:
Endothelial cells in the biology of factor VIII
N. Engl. J. Med. 296 (1977) 377
82. Janka, H.U.:
Spätfolgen des Diabetes mellitus
Der inform. Arzt 15 (1981) 26

83. Janka, H.U.:
Thrombozytenfunktion bei diabetischer Angiopathie
Stuttgart, Thieme (1983) (Thieme-Copytek)
84. Janka, H.U., Grünwald, P., Waldmann, G., Standl, E., Mehnert, H.:
Carotisstenosen, kardiovaskuläres Risikoprofil und assoziierte Makroangiopathie bei Diabetikern
Vasa 11 (1982) 111
85. Janka, H.U., Standl, E.:
Thrombozytenaggregation im diabetischen Koma: Beziehungen zum Gehalt von zyklischem AMP und zur Prostazyklin (PG I₂) stimulierbaren Adenylatzyklase-Aktivität der Thrombozyten
Intensivmed. 16 (1979) 275
86. Janka, H.U., Standl, E.:
Thrombozyten-Aggregation und -Adenylatzyklase-Aktivität bei Diabetikern
In: Hämostase bei Herzfehlern und Angiopathien (Hrsg.: Schreiber, R., Bühlmeier, K.)
Müller und Steinicke München (1981) 76
87. Janka, H.U., Standl, E., Mehnert, H.:
Increased platelet adenylate cyclase activity in diabetic patients with microangiopathy
Horm. Metabol. Res. 26 (Suppl. 11) (1981)
88. Janka, H.U., Standl, E., Mehnert, H.:
Peripheral vascular disease in diabetes mellitus and its relation to cardiovascular risk factors: screening with the Doppler ultrasonic technique
Diabetic Care 3 (1980) 207
89. Johnson, M., Harrison, H.E., Raftery, A.T., Elder, J.B.:
Vascular prostacyclin may be reduced in diabetes in man
Lancet 1 (1979) 325
90. Johnson, R.A., Morton, D.R., Kinney, J.H., Gorman, R.R., McGuire, J.C., Sun, F.F., Whittaker, N., Bunting, S., Salmon, J., Moncada, S., Vane, J.R.:
The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin)
Prostaglandins 12 (1976) 915
91. Jones, R.L., Peterson, C.M.:
Hematologic alterations in diabetes mellitus
Am. J. Med. 70 (1981) 339

92. Karpatkin, S.:
Biochemical and clinical aspects of megathrombocytes
Ann. NY Acad. Sci. 201 (1972) 262
93. Karpatkin, S.:
Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic
and kinetic evidence suggestive of young and
old platelets
J. Clin. Invest. 48 (1969) 1073
94. Karpatkin, S.:
Studies on human platelets glycolysis. Effect of
glucose, cyanide, insulin, citrate and agglutina-
tion and contraction on platelet glycolysis
J. Clin. Invest. 46 (1967) 409
95. Killackey, J.J., Philp, R.B., Hamilton, J.T.:
Methylxanthine inhibition of platelet phosphodie-
sterases and the related effects on platelet
aggregation
Proc. Canad. Fed. Biol. Soc. 21 (1978) 171
96. Kloeze, J.:
Relationship between chemical structure and
platelet aggregation activity of prostaglandins
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 187 (1969) 285
97. Komori et al.:
Reduced prostacyclin production in diabetic
patients with vascular complication
Diabetologia 3 (1983) 431 - Reference No: 891
98. Kwaan, H.C., Colwell, J.A., Cruz, S., Suwanwela, N.,
Dobbie, J.G.:
Increased platelet aggregation in diabetes mellitus
J. Lab. Clin. Med. 80 (1972) 236
99. Lagarde, M., Guichardant, M., Menashi, S.,
Crawford, N.:
The phospholipid and fatty acid composition of
human platelet surface and intracellular membranes
isolated by high voltage free flow electrophoresis
J. Biol. Chem. 257 (1982) 3100
100. Lands, W.E.M.:
The biosynthesis and metabolism of prostaglandins
Ann. Rev. Physiol. 41 (1979) 633

101. Lands, W.E.M., Smith, W.L.:
Prostaglandins and arachidonate metabolites
In: Methods in Enzymology, vol. 86 Academic Press,
New York 1982
102. Lapetina, E.G., Schmitges, C.J., Chandrabose, K.,
Cuatrecasas, P.:
Cyclin adenosine 3'5'-monophosphate and prostacyclin
inhibit membrane phospholipase activity in platelets
Biochem. biophys. Res. Comm. 76 (1977) 828
103. Laurell, C.B.:
Quantitative estimation of proteins by electro-
phoresis in agarosegel containing antibodies
Anal. Biochem. 15 (1966) 45
104. Leitner, C., Sinzinger, H., Silberbauer, K.:
Prostazyklin - ein Schutzfaktor für die Blutgefäße
Fortschr. Med. 98 (1980) 1845
105. Liebermann, G.E., Lewis, G.P., Peters, T.J.:
Am membrane-bound enzyme in rabbit aorta capable
of inhibiting ADP-induced platelet aggregation
Lancet 2 (1977) 330
106. Ludlam, C.A., Cash, J.D.:
Studies on the liberation of 8-TG from human
platelets in vitro
British Journal of Haematology 33 (1976) 239
107. Ludlam, C.A., Moore, S., Bolton, A.E., Pepper, D.S.,
Cash, J.D.:
The release of a human platelet-specific protein
measure by radioimmuno assay
Thromb. Res. 6 (1975) 543
108. Lufkin, E.G., Fass, D.N., O'Fallon, W.M.,
Bowie, E.J.W.:
Increased von Willebrand factor in diabetes mellitus
Metabolism 28 (1979) 63
109. Mac Intyre, D.E.:
Platelet prostaglandin receptors
Thromb. Haemost. 41 (1981) 211
110. Marcus, A.J.:
Platelet aggregation
In: Colman, R.W., Hirsch, J., Marder, V.J. Salzman,
E.W. (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis
J.B. Lippincott, Philadelphia - Toronto (1982) 380

111. Marcus, A.J.:
The role of prostaglandins in platelet function
Progr. Haematol. 11 (1979) 147
112. Marcus, A.J., Weksler, B.B., Jaffe, E.A.,
Broekman, M.J.:
Synthesis of prostacyclin from platelet-derived
endoperoxides by cultured human endothelial cells
J. Clin. Invest. 66 (1980) 979
113. Marks, H.H., Krall, L.P.:
Onset, course, prognosis and mortality
in diabetes mellitus
In: Mable, A., White, P., Bradley, R.F., Krall, L.P.
(Hrsg.): Joslin's Diabetes mellitus
(Lea & Febinger: Philadelphia 1971) 209
114. Maurin, N., Angelkort, B.:
Bestimmung des Prostacyclin-Metaboliten 6-keto-
Prostaglandin $F_{1\alpha}$ im extrahierten Plasma mit
einem ^{125}J -RIA-Kit
Herzmedizin 7 (1984) 82
115. Maurin, N., Angelkort, B.:
Bestimmung von Thromboxan B_2 im Plasma mit
einem ^{125}J -RIA-Kit
Herzmedizin 7 (1984) 5
116. Mc Cann, D., Tokarsky, S., Sorkin, R.:
Clin. Chem. 27 (1981) 1417
117. McLaren, E.H., Cullen, D.R., Brown, M.J.:
Coagulation abnormalities in diabetic coma
and 24 hours after treatment
Diabetologia 15 (1979) 345
118. Miller, O.V., Gorman, R.R.:
Evidence for distinct prostaglandin I_2 und D_2
receptors in human platelets
J. Pharmacol. exp. Ther. 210 (1979) 134
119. Mills, D.C.B., Smith, J.B.:
The influence on platelet aggregation of drugs
that effects the accumulation of adenosin
3':5'-cyclic monophosphate in platelets
Biochem. J. 121 (1971) 185

120. Minkes, M., Stanford, N., Chi, M.M.-Y., Roth, G.J., Raz, A., Needleman, P., Majerus, P.W.:
Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate inhibits the availability of arachidonate to prostaglandin synthetase in human platelet suspension
J. clin. Invest. 59 (1977) 449
121. Mizuno, K., Yamamoto, S., Lands, W.E.M.:
Effects of non-steriodal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities
Prostaglandins 23 (1982) 743
122. Moncada, S., Gryglewski, R.J., Bunting, S., Vane, J.R.:
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation
Nature (Lond.) 263 (1967) 663
123. Moncada, S., Higgs, E.A., Vane, J.R.:
Human arterial and venous tissue generate prostacyclin (prostaglandin X)-a potent inhibitor of platelet aggregation
Lancet 1 (1977) 18
124. Moncada, S., Vane, J.R.:
Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls
N. Engl. J. Med. 300 (1979) 1142
125. Moncada, S., Vane, J.R.:
In biochemical aspects of prostaglandins and thromboxanes (edited by N. Kharasch and J. Friend)
New York (1977) 155
126. Moncada, S., Vane, J.R.:
Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin
Pharmacol. Rev. 30 (1979) 293
127. Moore, S., Pepper, D.S.:
Identification and characterisation of a platelet-specific release product: β -thromboglobulin
In: Platelets in Biology and Pathology. Gordon, J.L. (Ed.), Elsevier, Amsterdam (1976) 293

128. Moore, S., Pepper, D.S., Cash, J.D.:
The isolation and characterisation of a platelet-specific β -globulin (β -tromboglobulin) and the detection of antiurokinase and antiplasmin released from thrombin-aggregated washed human platelets
Biochemica et Biophysica Acta 379 (1975) 360
129. Morris, H.G., Sherman, N.A., Shepperdson, F.T.:
Prostaglandins, 21 (1981) 771
130. Mustard, J.F., Packham, M.A.:
Editorial retrospective - Platelets and diabetes mellitus
N. Engl. J. Med. 311 (1984) 665
131. O'Brien, J.R.:
The adhesiveness of native platelets and its prevention
J. Clin. Path. 14 (1961) 140
132. O'Malley, B.C., Ward, J.D., Timperly, W.R., Porter, N.R., Preston, F.R.:
Platelet abnormalities in diabetic peripheral neuropathy
Lancet 2 (1975) 1274
133. Owen, N.E., Le Breton, G.C.:
 Ca^{++} mobilisation in blood platelets as visualized by chlortetracycline fluorescence
Amer. J. Physiol. 241 (1981) H613
134. Pace-Asciak, C.R.:
Oxidative biotransformation of arachidonic acid
Prostaglandins 13 (1977) 811
135. Pandolfi, M., Almér, L.O., Holmberg, L.:
Increased von Willebrand-antithaemophilic factor A in diabetic retinopathy
Acta Ophthalmol. 52 (1974) 823
136. Paton, R.C.:
Haemostatic changes in diabetic coma
Diabetologia 21 (1981) 172
137. Paton, R.C., Passa, Ph., Canivet, J.:
Von Willebrand Factor. Diabetes Mellitus and Retinopathy
Horm. Met. Res. (Suppl. 11) (1981) 55

138. Pearson, J.D., Carleton, J.S., Gordon, J.L.:
Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes
of vascular endothelial and smooth-muscle cells
in culture
Biochem. J. 190 (1980) 421
139. Peskar, B.A., Steffens, C., Peskar, B.M.:
Radioimmunoassay of 6-keto-PG F_{1α} in
biological material
In: Albertini, A., Da Prada, M., Pekar, B.A. (eds.):
Radioimmunoassay of Drugs and Hormones in Cardio-
vascular Medicine, p. 239. Elsevier/North-Holland
Biomedical Press, Amsterdam - New York - Oxford
(1979)
140. Petersen, H.D., Gormsen, J.:
Platelet aggregation in diabetes mellitus
Acta Med. Scand. 203 (1978) 125
141. Peterson, C.M., Jones, R.L., Koenig, R.J.,
Melvin, E.T., Lehrmann, M.L.:
Reversible hematological sequelae of
diabetes mellitus
Ann. Intern. Med. 86 (1977) 425
142. Porta, M., Hilgard, P., Kohner, E.M.:
Platelet shape change abnormalities in
diabetic retinopathy
Diabetologia 18 (1980) 217
143. Powel, W.:
Prostaglandins, 20 (1980) 947
144. Preston, F.E., Ward, J.D., Marcola, B.H., Porter,
N.R., Timperly, W.R., O'Malley, B.C.:
Elevated β -thromboglobulin levels and circulating
platelet aggregates in diabetic microangiopathy
Lancet 1 (1978) 238
145. Preston, F.E., Whipps, S., Jackson, C.A., French,
A.J., Wyld, P.J., Stoddard, C.J.:
Inhibitor of prostacyclin and platelet thromboxane
A₂ after low-dose aspirin
N. Engl. J. Med. 304 (1981) 76
146. Ratnoff, O.D.:
The substructure of antihemophilic factor (AHF,
factor VIII): some clearing in the fog
J. Lab. Clin. Med. 89 (1977) 1159

147. Reimers, H.-J.:
Die Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese
der Koronarthrombose
Hämostaseologie 1 (1981) 13
148. Rittenhouse-Simmons, S., Deykin, D.:
Release and metabolism of arachidonate
in human platelets
Thromb. Haemost. 41 (1981) 349
149. Ritter, J.M., Barrow, S.E., Blair, I.A.,
Dollery, C.T.:
Release of prostacyclin in vivo and its role in man
Lancet 1 (1983) 317
150. Roberts, S.M., Scheinmann, F. (Hrsg.):
New synthetic routes to prostaglandins and
thromboxanes
Academic Press, London (1982)
151. Rodan, G.A., Feinstein, M.B.:
Interrelationship between Ca^{++} and adenylate and
guanylate cyclases in the control of platelet
secretion and aggregation
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 73 (1976) 1829
152. Roeschlau, P.:
Cholesterinesterase: Cholesterinoxidase-
Farbreaktion
Z. Klin. Chemie Klin. Biochem. 12 (1974) 403
153. Rosenkranz, B., Fischer, C., Weimer, K.E. et al.:
Metabolism of prostacyclin and 6-keto-prosta-
glandin $F_{1\alpha}$ in man
J. Biol. Chem. 255 (1980) 10194
154. Ross, R., Glomset, J.A.:
The pathogenesis of atherosclerosis
New Engl. J. Med. 295 (1976) 369
155. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Harker, L.A.:
A platelet-dependant serum factor that stimulates
the proliferation of arterial smooth muscle cell
in vitro
Proc Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 1207
156. Roth, R.G., Stanford, N., Majerus, P.W.:
Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 72 (1975) 3073

157. Sagel, J., Colwell, J.A., Crook, L., Laimins, M.:
Increased platelet aggregation in early
diabetes mellitus
Ann. Intern. Med. 82 (1972) 733
158. Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A., Sixma, J.J.:
Adhesion of human blood platelets to human artery
subendothelium is mediated by Factor VIII: VWF
bound to subendothelium
Nature 279 (1979) 636
159. Salmon, J.A.:
A radioimmunoassay for 6-keto-PG F_{1α}
Prostaglandins 15 (1978) 383
160. Salzmänn, E.W.:
Cyclic AMP and platelet function
New. Engl. J. Med. 286 (1972) 358
161. Schernthaner, G., Silberbauer, K., Sinzinger, H.,
Müller, M.:
Plasma β-thromboglobulins and glycosylated haemo-
globin (Hb A) in type I and II diabetes mellitus
Thromb. Haemostas. 42 (1979) 334
162. Schernthaner, G., Sinzinger, H., Silberbauer, K.,
Freyler, H., Mühlbauer, I., Kaliman, J.:
Vascular postacyclin, platelet sensitivity to
prostaglandins and platelet specific proteins
in diabetes mellitus
Horm. Metabol. Res. Suppl. 11 (1981) 33
163. Schneider, W., Morgenstern, E.:
Zellbiologische Grundlagen der Plättchenfunktion.
Prakt. Anwendung der Thrombozytendiagnostik
(Hrsg. v. Voss, Göbel) Thieme (1980) 1
164. Schoene, N.W., Facono, J.M.:
Stimulation of platelet phospholipase A₂
activity by aggregating agents
Fed. Proc. 34 (1975) 257
165. Seiss, W., Dray, F.:
J. Lab. Clin. Med., 99 (1982) 388
166. Shattil, S.J., Bennet, J.S.:
Platelets and their membranes in hemostasis:
Physiology and pathophysiology
Ann. Intern. Med. 94 (1980) 168

167. Siess, W., Scherer, B., Böhling, H., Roth, P.,
Kurzmann, I., Weber, P.C.:
Platelet-membrane fatty acids, platelet aggregation
and thromboxane formation during a mackerel diet
Lancet 1 (1980) 441
168. Silberbauer, K., Schernthaner, G., Sinzinger, H.,
Piza-Katzer, H., Winter, M.:
Decreased vascular prostacyclin in
juvenile-onset diabetes
N. Engl. J. Med. 300 (1979) 367
169. Silberbauer, K., Schernthaner, G., Sinzinger, H.,
Winter, M., Piza-Katzer, H.:
Juveniler Diabetes mellitus: Verminderte Prosta-
cyclin (PG I₂)-Synthese in der Gefäßwand
VASA 8 (1979) 213
170. Sinzinger, H., Reiter, S., Peskar, B.A.:
Removal, preparation and storage of human plasma for
radioimmunological detection of prostaglandins
Poster auf dem "2nd Int. Symp. on Prostaglandins",
Nürnberg-Fürth, Mai 1984
171. Sinzinger, H., Silberbauer, K.:
Zum gegenwärtigen Stand der Prostacyclin-Story
für die Klinik
VASA 10 (1981) 70
172. Skidgel, R.A., Printz, M.P.:
PG I₂ production in rat blood vessels: diminished
prostacyclin formation in veins compared to arteries
Prostaglandins 16 (1978) 1
173. Standl, E., Janka, H.U., Mehnert, H.:
Lebensvers. Med. 84 (1982) 33
174. Stuart, M.J., Gerrard, J.M., White, J.G.:
Effect of cholesterol on production of
thromboxane B₂ by platelets in vitro
N. Engl. J. Med. 302 (1980) 6
175. Tateson, J.E., Moncada, S., Vane, J.R.:
Effects of prostacyclin (PG X) on cyclic AMP
concentration in human platelets
Prostaglandins 13 (1977) 389

176. Tschopp, T.B., Baumgartner, H.R.:
Prostacyclin (PG I₂) aus Gefäßmuskelzellen hemmt
Plättchenadhesion² und -aggregation auf dem
Subendothel von Arterien
In: Hämostase, Thrombophilie und Arteriosklerose.
Hrsg. J. van der Loo, F. Asbeck, Schattauer,
Stuttgart (1982) 489
177. Virchow, R.:
Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem
In: Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen
Medizin. Meidinger, Frankfurt/M. (1856) 458
178. Wahlefeld, A.W.:
Methoden der enzymatischen Analyse, 2nd edit.,
Bergmeyer, H.U., Verlag Chemie, Weinheim (1974) 1878
179. Walter, E., Deppermann, D., Badewien, I., Wahl, P.,
Weber, E.:
Aggregation und Adhäsion sowie Glucosyltrans-
feraseaktivität der Thrombozyten verschiedener
Diabetiker-Gruppen
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 83 (1977) 1169
180. Walter, H., Kemmler, W., Kronski, D., Franetzki,
M., Prestele, K., Mehnert, H.:
Therapie einer Typ-I-Diabetikerin mit Hilfe eines
implantierten, programmierbaren Insulindosiergeräts
Akt. Endokrin. 3 (1982) 48
181. Weiss, H.J., Turitto, V.T.:
Prostacyclin (prostaglandin I₂, PG I₂)
inhibits platelet adhesion and thrombus
formation of subendothelium
Blood 53 (1979) 244
182. Weksler, B.B., Nachmann, R.L.:
Platelets and atherosclerosis
Amer. J. Med. 71 (1981) 331
183. White J.G., Rao, G.H.R., Gerrard, J.M.:
Effects of the ionophore A 23187 on blood platelets.
Influence on aggregation and secretion
Amer. J. Pathol. 77 (1974) 135
184. Zahavi, J., Betteridge, D.J., Jones, N.A.G.,
Leyton, J., Galton, D.J., Kakkur, V.V.:
Enhanced in-vivo platelet release reaction in
diabetic patients with retinopathy
In: Angiology and Thrombosis, Sero Symposia,
Academic Press, London 1981

185. Zahavi, J., Jones, N.A.G., Betteridge, D.J., Leyton, J., Galton, D.J., Clark, S.E., Kakkar, V.V.:
Platelet factor 4, β -thromboglobulin, malondialdehyde formation and blood lipids in patients with diabetes mellitus
Thromb. Haemostas. 42 (1979) 334
186. Zahavi, J., Jones, N.A.G., Leyton, J., Dubiel, M., Kakkar, V.V.:
Enhanced in-vivo platelet "release reaction" in old healthy individuals
Thromb. Res. 17 (1980) 329
187. Ziboh, V.A., Maruta, H., Lord, J., Cagle, W.D., Lucky, W.: Increased biosynthesis of thromboxane A_2 by diabetic platelets
Edr. J. Clin. Invest. 9 (1979) 223

Lebenslauf

18.10.1958	geboren in München Eltern: Theodor und Ingrid Eyrich
1965 - 1969	Besuch der Grundschule in München
1969 - 1978	Besuch des Gymnasiums des kath. Familienwerks in Pullach bei München
29.06.1978	Reifeprüfung
1978 - 1980	Ableistung des Zivildienstes
1980	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
22.03.1983	Ärztliche Vorprüfung
22.03.1984	1. Teil der Ärztlichen Prüfung
21.03.1986	2. Teil der Ärztlichen Prüfung
22.06.1987	3. Teil der Ärztlichen Prüfung
30.06.1987	Approbation zum Arzt

